

SÉRIE A, N° 3092

N° D'ORDRE :

3964

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

CHRISTIANE TRIPPIER DE LOZÉ

1^{re} THÈSE. — SPECTRES INFRA-ROUGES ET STRUCTURE DES
DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINES ET DE LEURS
CONSTITUANTS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 10 ^{Mars} 1958 devant la Commission d'examen.

MM. WURMSER..... *Président.*

MONNIER.

CHAMPETIER.....

LENORMANT.....

} *Examineurs.*

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

1958

SÉRIE A, N° 3092

N° D'ORDRE :

3964

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

CHRISTIANE TRIPPIER DE LOZÉ

1^{re} THÈSE. — SPECTRES INFRA-ROUGES ET STRUCTURE DES
DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINES ET DE LEURS
CONSTITUANTS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le mai 1958 devant la Commission d'examen.

MM. WURMSER *Président.*

MONNIER }

CHAMPETIER }

LENORMANT }

Examineurs.

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

420, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

1958



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÉS.

PROFESSEURS

G. JULIA.....	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	WIEMANN.....	T	Chimie organ. structurale.
FOCH.....	T	Mécanique physique et expérimentale.	JACQUINOT.....	T	Spectroscopie et Physique céleste.
PAUTHENIER.....	T	Électrotechnique générale	VASSY.....	T	Physique de l'atmosphère
DE BROGLIE.....	T	Théories physiques.	DESTOUCHES.....	T	Théories physiques.
PRENANT.....	T	Anatomie et Histologie comparées.	M. PRUVOST.....	T	Géologie.
GARNIER.....	T	Géométrie supérieure.	AMIEL.....	T	Chimie (P.C.B.).
PÉRÉS.....	T	Mécanique des fluides et applications.	HOCART.....	T	Minéralogie.
LAUGIER.....	T	Physiologie générale.	J.-P. MATHIEU.....	T	Physique (P.C.B.).
M. CURIE.....	T	Physique (P.C.B.).	COUTEAUX.....	T	Biologie animale (P.C.B.).
BARRABÉ.....	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	MAY.....	T	Biologie animale (P.C.B.).
G. DARMOIS.....	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	CROQUET.....	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.
JACQUES BOURCART.....	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	FELDMANN.....	T	Biologie (P.C.B.).
PLANTFOL.....	T	Botanique.	GUINIER.....	T	Physique (P.C.B.).
GRASSÉ.....	T	Évolution des êtres organisés.	JOST.....	T	Biologie (P.C.B.).
PRÉVOST.....	T	Chimie organique.	FORTET.....	T	Calcul des probabilités
BOULIGAND.....	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	SCHWARTZ.....	T	Méthodes mathémat. de la Physique.
CHAUDRON.....	T	Chimie appliquée.	CHOUARD.....	T	Physiologie végétale.
WYART.....	T	Minéralogie.	MALAVARD.....	T	Aviation.
TEISSIER.....	T	Zoologie.	BRELOT.....	T	Calcul différentiel.
MANGENOT.....	T	Biologie végétale.	NORMANT.....	T	Chimie (P.C.B.).
P. AUGER.....	T	Physique quantique et relativité.	BÉNARD.....	T	Chimie (P.C.B.).
MONNIER.....	T	Physiol. des Fonctions.	BOVAT.....	T	Botanique (E.N.S.).
PIVETEAU.....	T	Géologie.	DUGUÉ.....	T	Statistiques mathématiques.
ROCARD.....	T	Physique (E.N.S.).	GELOSO.....	T	Chimie (S.P.C.N.).
H. CARTAN.....	T	Mathématiques (E.N.S.).	SOULAIRAC.....	T	Psychophysiologie.
LAFFITTE.....	T	Chimie générale.	ULRICH.....	T	Physiologie végétale.
FAVARD.....	T	Mécanique générale	MARÉCHAL.....	T	Optique théorique et appliquée.
COULOMB.....	T	Physique du Globe.	KIRRMANN.....	T	Théories chimiques.
M ^{lle} COUSIN.....	T	Biologie animale (P.C.B.).	CHADEFAUD.....	T	Botanique.
CHRÉTIEN.....	T	Chimie minérale.	DESTRIAU.....	T	Physique (M.P.C.).
P. DRACH.....	T	Zoologie.	M ^{lle} LE BRETON.....	T	Physiologie générale.
KASTLER.....	T	Physique.	SALEM.....	T	Mathématiques générales
ÉPHRUSSI.....	T	Génétique.	LELONG.....	T	Mathématiques générales
WURMSER.....	T	Biologie physico-chimique	DEVILLERS.....	T	Anatomie et Histologie comparées.
RIVIÈRE.....	T	Géologie (S.P.C.N.).	EHRESMANN.....	T	Topologie algébrique.
GAUTHIERET.....	T	Biologie végétale (P.C.B.).	FRANÇON.....	T	Physique (M.P.C.).
LUCAS.....	T	Recherches physiques.	GLANGEAUD.....	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
A. THOMAS.....	T	Biologie cellulaire.	GODEMENT.....	T	Mathématiques (M.P.C.).
ARNULF.....	T	Optique appliquée.	PISOT.....	T	Calcul des probabilités.
MAX MORAND.....	T	Physique.	E. ROCH.....	T	Géologie.
SOLEILLET.....	T	Physique.	SCHATZMANN.....	T	Astrophysique.
FORTIER.....	T	Mécanique expérimentale des fluides.	TERMIER.....	T	Paléontologie stratigraphique.
DANJON.....	T	Astronomie.	ZAMANSKY.....	T	Mathématiques générales.
LAPORTE.....	T	Physique générale et Radioactivité.	JOLIOT.....	T	Physique nucléaire et Radioactivité.
JANET.....	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	LENNUIER.....	T	Physique (P.C.B.).
PETIT.....	T	Biologie maritime.	RIZET.....	T	Génétique.
QUENEY.....	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.	M ^{me} TONNELAT.....	T	Théories physiques
GALLIEN.....	T	Embryologie.	DIXMIER.....	T	Mathématiques (M.P.C.)
EICHORN.....	T	Biologie végétale (P.C.B.).	SOUGHAY.....	T	Chimie (P.C.B.).
DE CUGNAC.....	T	Biologie végétale (P.C.B.).	AIGRAIN.....	T	Physique (P.C.B.).
M ^{lle} CAUCHOIS.....	T	Chimie physique.	BRUSSET.....	T	Chimie (P.C.B.).
THELLIER.....	T	Physique du Globe.	M. LEVY.....	T	Physique théorique.
L'HÉRTIER.....	T	Génétique.	LENORMANT.....	T	Physiologie.
GRIVET.....	T	Radioélectricité.	M ^{me} CHAIX.....	T	Chimie biologique.
PONCIN.....	T	Mécanique des fluides	M ^{me} HUREL-PY.....	T	Biologie végétale (P.C.B.).
DUBREIL.....	T	Arithm. et théorie des nombres.	PIAUX.....	T	Chimie (P.C.B.).
QUELET.....	T	Chimie organique.	BRUN.....	T	Mécanique expérimentale des fluides.
GAGNIARD.....	T	Géophysique appliquée.	LEDERER.....	T	Chimie biologique.
CHAMPETIER.....	T	Chimie macromoléculaire.	M ^{me} DUBREIL-JACOTIN.....	T	Mathématiques.
CUVILLIER.....	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	M ^{me} LELONG-FERHAND.....	T	Mathématiques (E.N.S.).
JUNG.....	T	Pétrographie.	BELLAÏR.....	T	Géologie (S.P.C.N.).
TRILLAT.....	T	Microscopie et diffraction électronique.	COTTE.....	T	Physique (M.P.C.).
			J. DUBOIS.....	T	Chimie.
			LAMOTTE.....	T	Zoologie.
			LE ROLLAND.....	T	Mécanique des fluides.
			MICHEL.....	T	Chimie (P.C.B.).
			OLMER.....	T	Chimie énergétique générale.

Secrétaire Général CH. MONIER.

A MON MAÎTRE

MONSIEUR H. LENORMANT
Professeur à la Faculté des Sciences

AVANT-PROPOS

« The imposition of design on nature is in fact an act of artistic creation on the part of the man of science, though it is subject to a discipline more exacting than that of poetry and painting. »

C. N. HINSELWOOD.

Je dois ma formation scientifique à M. le Professeur Lenormant, auprès de qui j'ai trouvé chaque jour, depuis six ans, la science d'un maître et les conseils d'un ami. Il a dirigé le présent travail avec une attention rigoureuse tempérée d'un bienveillant humour. Je suis heureuse de lui exprimer ici ma reconnaissance et ma respectueuse affection.

C'est dans le laboratoire de M. le Professeur Monnier que j'ai effectué mes recherches. J'ai pu apprécier maintes fois l'accueil cordial qu'il sait réserver à ses élèves, et les ressources d'un savoir encyclopédique qu'il met à leur service. Je désire lui témoigner ma respectueuse et affectueuse gratitude.

Je remercie M. le Professeur Wurmser de la bienveillance avec laquelle il a suivi et encouragé mes travaux depuis six ans, et accepté de présider le jury de cette thèse.

Je n'aurais pu mener à bien mes recherches si M. Lecomte, Directeur de Recherches au C. N. R. S., n'avait mis à ma disposition le spectrographe sur lequel ont été enregistrés la plupart des spectres dont il est question dans cet ouvrage. Je tiens à le remercier, ainsi que les chercheurs de son laboratoire (en particulier Mlle Morandat), de l'hospitalité qui m'a été si aimablement offerte.

M. le Professeur Price m'a accueillie au Département de Physique de King's College pour un séjour qui m'a été aussi utile qu'agréable. Je suis redevable au Docteur Wilkins et à ses collaborateurs d'intéressantes discussions qui m'ont permis de mettre au point l'interprétation de mes résultats.

J'exprime toute ma reconnaissance à M. le Professeur Champetier qui a accepté de faire partie de mon jury, et dont les avis m'ont été très profitables.

Je remercie le Docteur Blout des nombreux renseignements qu'il m'a communiqués et des précieux produits qu'il m'a envoyés, et le Docteur Bessis des lyophilisations qu'il a bien voulu faire effectuer dans son laboratoire.

Enfin ma gratitude s'adresse à tous mes camarades qui par leur aide (en particulier Mme Legoux) et leur amitié m'ont aidée à mener à bien ce travail.

SPECTRES INFRA-ROUGES ET STRUCTURE DES DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINES ET DE LEURS CONSTITUANTS

Par CHRISTIANE DE LOZÉ

INTRODUCTION

L'importance de la structure en biologie a été pressentie depuis longtemps. Pasteur donna une démonstration indirecte de son rôle, lorsqu'il montra que l'acide tartrique racémique pouvait être dédoublé en ses inverses optiques par une méthode basée sur l'utilisation préférentielle de l'acide dextrogyre par les microorganismes.

Pour beaucoup de substances biologiquement actives, formées de molécules relativement simples, on a pu établir une relation entre activité et structure. Ainsi, l'adrénaline naturelle est lévogyre, elle est quinze fois plus active que le produit dextrogyre.

Pour expliquer l'activité de substances biologiques plus complexes telles que les anticorps, virus, enzymes, etc., il semblerait venir tout naturellement à l'esprit de faire intervenir des données structurales : en effet, la plupart de ces substances sont formées de protéines simples ou conjuguées, et il paraît normal que les propriétés de ces grosses molécules soient en rapport, non seulement avec leur constitution chimique, mais encore avec leur architecture. Or, pendant longtemps, on a étudié l'activité des protéines en relation seulement avec des caractères chimiques (présence de groupements actifs, nature des acides aminés, etc.).

On avait cependant remarqué que, d'une manière générale, leur inactivation par des agents comme la chaleur, les changements de pH, certaines substances (détergents, urée, éthanol, etc...) ne correspon-

dait pas à des modifications chimiques significatives mais s'accompagnait de modifications physiques (en particulier de la solubilité). On désignait ce phénomène sous le nom de dénaturation sans savoir quelles transformations il recouvrait exactement.

On a montré qu'en fait la dénaturation est essentiellement une altération structurale. C'est de cette manière qu'on a expliqué, par exemple, le comportement de l'insuline, qui peut être inactivée par chauffage en solution acide, et retrouver son activité et ses propriétés physiques quand elle est redissoute en milieu alcalin (¹ à ⁴). La réversibilité du phénomène indique qu'il ne s'est pas produit de modification importante dans la composition chimique de la substance. Elliott et Ambrose (⁵) (⁶) ont montré qu'il s'agissait d'une transformation de structure, la protéine active est en forme α , la protéine inactive en forme β .

Il est remarquable qu'une autre sorte de hauts polymères, les acides nucléiques, présente des exigences structurales du même ordre.

Ces acides jouent un rôle primordial en biologie. Non seulement ils forment, en combinaison avec des protéines, les principaux constituants de la cellule, mais encore ils ont un rôle dynamique, puisqu'ils sont impliqués dans tous les processus de division et de croissance. Les recherches modernes ont mis en évidence l'importance particulière de l'acide désoxyribonucléique (DNA), qui semble pouvoir être identifié avec le matériel génétique de la cellule (⁷ à ¹⁰). La dépolymérisation du DNA, les effets de la chaleur et les modifications de pH , qui altèrent sa structure, se traduisent par des changements de l'activité (¹¹) (¹²).

Le rôle des protéines associées au DNA est encore mal connu. Les chromosomes semblent indubitablement formés d'une combinaison de

(¹) T. D. GERLOCH et R. W. BATES, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1932, **45**, 19.

(²) V. DU VIGNEAUD, E. M. K. GEHLING et C. A. EDDY, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1928, **33**, 497.

(³) D. F. WAUGH, *Am. J. Physiol.*, 1941, **133**, 484.

(⁴) D. F. WAUGH, *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 247.

(⁵) A. ELLIOTT, E. J. AMBROSE et C. ROBINSON, *Nature*, 1950, **166**, 194.

(⁶) E. J. AMBROSE et A. ELLIOTT, *Proc. Roy. Soc. London*, 1951, A **208**, 75.

(⁷) J. SCHULTZ et T. CASPERSSON, *Arch. Exptl. Zellforsch. Gewebesucht*, 1939, **22**, 650.

(⁸) T. CASPERSSON, *Chromosoma*, 1940, **1**, 562.

(⁹) O. T. AVERY, C. M. MAC LEOD et M. MAC CARTHY, *J. Exptl. Med.*, 1944, **79**, 137.

(¹⁰) B. EHRUSSI et H. TAYLOR, *Exptl. Cell Research*, 1951, **2**, 589.

(¹¹) M. MAC CARTY et O. T. AVERY, *J. Exptl. Med.*, 1946, **83**, 89.

(¹²) S. ZAMENHOF, *Phosphorus metabolism* (McElroy et Glass), 1952, vol. **2**, p. 301, John Hopkins Press (Baltimore).

ces deux constituants ⁽¹³⁾, mais au cours de la division cellulaire, le cycle des modifications n'est pas le même pour les protéines et pour l'acide nucléique ⁽⁸⁾. Par ailleurs, les protéines ne semblent jouer aucun rôle dans les transformations génétiques produites par le DNA chez les bactéries ⁽¹²⁾.

Si l'acide désoxyribonucléique a un rôle génétique manifeste, son rôle dans la synthèse protéique est plus difficile à mettre en évidence. Des expériences récentes ⁽¹⁴⁾ ont cependant indiqué que le DNA participe probablement à la synthèse des protéines du noyau, de la même manière que RNA semble lié à la synthèse des protéines cytoplasmiques ⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁶⁾ ⁽¹⁷⁾.

Il semble que la spécificité d'une molécule d'acide nucléique entraîne d'une certaine manière la spécificité de la protéine, si bien qu'à un arrangement déterminé des composants du DNA correspond un seul arrangement possible des aminoacides dans la chaîne polypeptidique. Gamow ⁽¹⁸⁾ a récemment exprimé ces relations sous la forme d'un transfert d'information du DNA aux protéines.

D'une manière générale, les problèmes de structure des hauts polymères n'ont été abordés qu'assez récemment et les résultats obtenus sont encore très incomplets. Les plus nombreux et les plus précis ont été apportés grâce aux rayons X. Quelques études ont également été faites à l'aide de la spectrographie infra-rouge.

C'est dans ce domaine que nous nous proposons de situer notre étude. Le principal avantage de la technique infra-rouge est qu'elle permet d'étudier les substances dans des conditions qui se rapprochent le plus possible des conditions naturelles, c'est-à-dire en solution. Par contre, les résultats obtenus sont parfois moins précis et moins directement conditionnés par la structure que ceux obtenus à l'aide des rayons X. C'est en confrontant les données fournies par ces deux techniques qu'on obtient les résultats les plus valables sur les structures étudiées.

Nous diviserons notre étude en quatre parties : dans la première, nous indiquerons les techniques utilisées ; nous consacrerons les deux suivantes à des résultats concernant les principaux constituants des nucléoprotéines, acides nucléiques (II^e partie), histone et protamine (III^e partie) ; nous aborderons dans la IV^e partie l'étude de la nucléohistone et de la nucléoprotamine.

⁽¹³⁾ J. P. GREENSTEIN, *Adv. in Prot. Chem.*, 1944, **4**, 209.

⁽¹⁴⁾ V. G. ALLFREY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1954, **40**, 881.

⁽¹⁵⁾ P. C. CALDWELL et C. N. HINSHELWOOD, *J. Chem. Soc.*, 1950, 3156.

⁽¹⁶⁾ F. HAUROWITZ, *Chemistry and Biology of Proteins*, 1950, Academic Press, New York.

⁽¹⁷⁾ A. L. DOUNCE, *Enzymologia*, 1952, **15**, 251.

⁽¹⁸⁾ G. GAMOW, A. RICH et M. YCAS, *Advances in Biological and Medical Physics*, 1956, vol. **3**, 23, Acad. Press Enc. Publishers, N. Y.

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUES

CHAPITRE PREMIER

Matériel.

Le matériel utilisé a été en majeure partie préparé par nous selon les techniques que nous exposons ci-dessous. Dans quelques cas, où certaines substances provenaient de l'extérieur, nous en indiquons l'origine.

Quel que soit le matériel qu'on désire obtenir, les opérations se succèdent toujours dans le même ordre : il faut tout d'abord isoler les noyaux ou les spermatozoïdes ; ensuite on peut extraire les désoxyribonucléoprotéines à partir de ces noyaux ou spermatozoïdes ; enfin, à partir de ces désoxyribonucléoprotéines, il est possible de séparer les constituants : acide nucléique et fraction protéique. Pour éviter des répétitions, nous exposerons dans cet ordre les différents procédés d'isolement ou d'extraction, bien que par la suite un ordre inverse soit adopté pour l'étude de ces substances.

§ I. — **Désoxyribonucléoprotéines (DNP)** — Deux méthodes principales, déjà esquissées dans l'œuvre de Miescher ⁽¹⁹⁾, ont été utilisées par de nombreux auteurs pour préparer les DNP. Dans l'une, le milieu d'extraction est constitué par des solutions salines concentrées ^(19 à 26), dans l'autre par des solutions de faible force ionique ^(27 à 35).

⁽¹⁹⁾ F. MIESCHER, *Die histochemischen und physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher gesammelt und herausgegeben von seinen Freunden*, 1897, Leipzig, F. C. W. Vogel.

⁽²⁰⁾ A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1942, **28**, 344.

⁽²¹⁾ A. W. POLLISTER et A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 1946, **30**, 101.

⁽²²⁾ H. EULER et L. HAHN, *Arkiv Kemi Mineral Geol.*, 1946, **22 A**, n° 17 et **23 A**, n° 5.

⁽²³⁾ M. L. PETERMAN et C. M. LAMB, *J. Biol. Chem.*, 1948, **76**, 685.

⁽²⁴⁾ G. FRICK, *Biochim. et Biophys. Acta*, 1949, **3**, 103.

⁽²⁵⁾ E. J. AMBROSE et J. A. V. BUTLER, *Disc. Far. Soc.*, 1953, n° 13, 261.

⁽²⁶⁾ M. FLEMING et D. O. JORDAN, *Disc. Far. Soc.*, 1953, n° 13, 217.

⁽²⁷⁾ L. LILIENFELD, *Z. Physiol. Chem.*, 1894, **18**, 473.

⁽²⁸⁾ W. HUISKAMP, *Z. Physiol. Chem.*, 1901, **32**, 145.

⁽²⁹⁾ E. HAMMARSTEN, *Biochem. J.*, 1924, **144**, 383.

⁽³⁰⁾ K. G. STERN, G. GOLDSTEIN, J. WAGMAN et J. SHRYVER, *Feder. Proc.*, 1947, **6**, 296.

⁽³¹⁾ K. G. STERN, G. GOLDSTEIN et H. G. ALBAUM, *J. Biol. Chem.*, 1951, **188**, 273.

⁽³²⁾ D. C. GAJDUSEK, *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, **5**, 397.

⁽³³⁾ M. H. BERNSTEIN et D. MAZIA, *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 600.

⁽³⁴⁾ J. A. V. BUTLER, P. F. DAVIDSON, D. N. F. JAMES et K. V. SHOOTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, **13**, 224.

⁽³⁵⁾ C. F. CRAMPTON, R. LIPSHITZ et E. CHARGAFF, *J. Biol. Chem.*, 1954, **206**, 499.

Nous avons préparé la nucléohistone à partir des noyaux de thymus de veau en employant les deux sortes de techniques et la nucléoprotamine à partir des spermatozoïdes de poisson en employant les solutions salines concentrées (comme nous le verrons plus loin, les solutions de faible force ionique, constituant le milieu naturel des spermatozoïdes, ne peuvent servir de liquide d'extraction).

Dans tous les cas, toutes les opérations ont été conduites à une température ne dépassant pas 4°C .

A) ISOLEMENT DES NOYAUX ET DES SPERMATOZOÏDES. — 1° *Noyaux*. — Les noyaux ont été isolés, à partir du thymus de veau, par les procédés classiques de centrifugation différentielle. Le milieu utilisé pour homogénéiser les tissus est un mélange de NaCl 0,1 M et de citrate de sodium 0,05 M (*).

Ce milieu ne conviendrait pas s'il s'agissait d'étudier les noyaux eux-mêmes, car il ne leur conserve pas leur intégrité morphologique. L'examen au microscope montre en effet des noyaux plus ou moins détruits ayant laissé échapper leur contenu sous forme de filaments. Il est plus exact de parler alors de « matériel nucléaire » que de noyaux. Cette altération morphologique ne présente pas d'inconvénients pour l'extraction. L'essentiel est de séparer le plus tôt possible le matériel nucléaire des autres éléments cellulaires, qui se composent essentiellement de ribonucléoprotéines, et qui contiennent en outre de nombreux enzymes risquant d'altérer les structures.

2° *Spermatozoïdes*. — Les spermatozoïdes sont recueillis dans du sérum physiologique et lavés trois fois par centrifugation. L'examen microscopique montre qu'ils demeurent en bon état morphologique.

B) EXTRACTION DE LA NUCLÉOHISTONE. — 1° *Extraction par les solutions salines concentrées*. — Nous avons utilisé dans ses grandes lignes la méthode de Mirsky et Pollister (³⁰) qui consiste en une série de dissolutions dans le NaCl 1,5 M, suivies de précipitations par dilution (la concentration en NaCl étant ramenée à 0,15 M).

Le dernier précipité peut être dissous dans l'eau et utilisé sous cette forme.

Pour examiner le produit en solution dans l'eau lourde, comme nous le faisons le plus souvent, il est préférable de sécher parfaitement la nucléohistone avant de la deutérer. A cet effet, on traite le précipité par l'alcool à 60 p. 100, qui dissout le sel restant, puis par l'alcool absolu, et on sèche sous vide en présence de P_2O_5 .

(*) Le citrate de sodium est destiné à supprimer l'action de la désoxyribonucléase.

(³⁰) A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, *J. Gen. Physiol.*, 1946, **30**, 101 et 117.

Il est à remarquer que l'extraction par des solutions salines concentrées supprime l'action de la désoxyribonucléase présente dans les tissus, l'enzyme étant inhibé par effet ionique ⁽³⁷⁾ ⁽³⁸⁾. On évite ainsi tout risque de dépolymérisation de l'acide nucléique au cours de la préparation.

Par contre, les solutions salines concentrées ont pour inconvénient d'opérer une dissociation de la désoxyribonucléoprotéine en ses deux fractions : DNA et histone ⁽²¹⁾ ⁽²⁹⁾ ^(35 à 39). La recombinaison qui a lieu dans la précipitation ne respecte certainement pas le mode d'association original des deux composants et, après une série de dissolutions et de reprécipitations, on obtient probablement une substance assez différente de la nucléohistone naturelle.

2° *Extraction par les solutions de faible force ionique.* — Nous avons utilisé une technique inspirée de celle de Crampton, Lipshitz et Chargaff ⁽³⁵⁾ qui comporte l'extraction de la nucléohistone par l'eau additionnée de citrate de sodium 0,005 M et sa précipitation par le NaCl 0,15 M. Nous y avons apporté quelques modifications (lavage des précipités, mode de clarification des liquides) destinées à éviter le plus possible des agrégations moléculaires susceptibles de modifier la structure de la nucléohistone naturelle ⁽⁴⁰⁾.

Le produit est purifié par plusieurs dissolutions, filtrations et précipitations successives et finalement déshydraté à l'alcool et séché sous vide en présence de P₂O₅ comme dans la technique précédente.

On peut espérer obtenir dans ces conditions une nucléohistone plus voisine de la nucléohistone naturelle que celle extraite par les sels.

Il est certain que, chimiquement parlant, la pureté du produit n'est pas absolue. Mais, dans la ligne de nos études, nous sommes moins préoccupés d'éliminer toute trace d'impureté que de conserver le mieux possible l'intégrité d'une structure moléculaire. Nous avons d'ailleurs observé que la plupart des chercheurs qui s'intéressent aux caractéristiques physiques de la nucléohistone ⁽⁴⁰⁾ travaillent sur ce qu'ils appellent un « matériel brut », c'est-à-dire sur un matériel nucléaire soigneusement isolé et extrait sans purifications ultérieures.

C) EXTRACTION DE LA NUCLÉOPROTAMINE. — La nucléoprotamine a été préparée à partir des spermes de saumon et de truite.

Les solutions de faible force ionique ne peuvent servir à l'extraction, puisqu'elles constituent le milieu naturel des spermatozoïdes. Nous avons donc repris la méthode de Mirsky et Pollister ⁽³⁶⁾ en élevant la concentration en NaCl de 1,5 M à 3 M.

⁽³⁷⁾ M. LASKOWSKI, *Arch. Biochem.*, 1946, **11**, 41.

⁽³⁸⁾ M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 1950, **33**, 349 et 363.

⁽³⁹⁾ I. BANG, *Beitr. Chem. Physiol. u. Path.*, **4**, 331 et **5**, 317.

⁽⁴⁰⁾ P. DOTY, M. H. F. WILKINS et collaborateurs, Communication personnelle.

La préparation comporte les mêmes étapes que dans le cas de la nucléohistone.

D) ASPECT DU MATÉRIEL OBTENU. — La nucléohistone et la nucléoprotamine extraites par les sels ont un aspect fibreux et forment avec l'eau des solutions hautement visqueuses.

La nucléohistone extraite par les solutions de faible force ionique est granuleuse, elle forme avec l'eau des solutions peu visqueuses, et ces caractères ne proviennent pas d'une dépolymérisation comme on pourrait le croire. En effet, si l'on dissout la nucléohistone granuleuse dans le NaCl 1.5 M, on retrouve un liquide très visqueux qui précipite en fibres par dilution. Par contre, à partir d'un matériel fibreux dissous dans l'eau, il est impossible d'obtenir un précipité granuleux.

Par conséquent, les caractères fibreux des échantillons secs et visqueux des solutions sont des caractères irréversibles qui trahissent l'action des hautes concentrations salines.

§ II. — *Fraction protéique : salmine, protamine et histone.* — A) SALMINE ET PROTAMINE. — Nous avons utilisé du sulfate de salmine et du sulfate de protamine (de hareng) provenant des laboratoires Hoffman Laroche (Paris).

Nous avons également employé du sulfate de protamine qui sert à la fabrication de l'insuline retard et qui nous a été fourni par les laboratoires Lematte et Boinot.

Dans les deux cas les produits sont extraits, à l'aide d'une méthode classique, par l'acide sulfurique dilué.

B) HISTONE. — Nous avons préparé l'histone, à partir de la nucléohistone, selon plusieurs procédés, dont nous discuterons ultérieurement (III^e partie, chap. II, § I) les avantages et les inconvénients.

1^o Le premier de ces procédés ne diffère que par quelques détails de celui décrit par Grégoire et Limozin (⁴¹). Il repose sur la dissociation des nucléoprotéines en solution saline concentrée (²¹) (²⁹) (³⁵ à ³⁹). On écarte l'acide nucléique et on obtient une solution d'histone que l'on peut utiliser sous cette forme ou lyophiliser (histone *a*).

2^o Le second procédé est celui de Crampton, Moore et Stein (¹²). La dissociation est réalisée très rapidement (30 minutes) par l'acétate de baryum 0,6 M (histone *b*).

3^o Nous avons enfin préparé l'histone d'une troisième manière, à partir de la nucléohistone dissoute dans l'eau et par conséquent non dissociée. On ajoute un volume d'acide chorhydrique N/10. L'acide

(⁴¹) E.-J. GRÉGOIRE et M. LIMOZIN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, **36**, 15.

(⁴²) C. F. CRAMPTON, S. MOORE et W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 1955, **215**, 787.

nucléique précipite. On écarte le précipité et on utilise ou on lyophilise la solution qui contient l'histone. Il est possible de purifier l'histone en la précipitant par le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation et en la redissolvant dans l'eau (il est nécessaire de dialyser pour éliminer le sulfate d'ammonium) (histone c).

Nous avons également étudié une histone préparée au Laboratoire de Biophysique à King's College (London) selon cette dernière méthode (histone d).

§ III. — **Acide désoxyribonucléique.** — Nous avons principalement utilisé un thymonucléate de sodium préparé par M. Abatte (Children's Cancer Research Foundation, Boston, Mass.) selon la méthode de Kay, Simmons et Dounce (⁴³) à partir du thymus de veau et contenant moins de 0,1 p. 100 de protéine.

Nous avons également, pour quelques expériences, extrait le DNA à partir du thymus de veau, par le procédé de Simmons, Chavos et Orbach (⁴⁴) assez comparable au précédent. La différence réside dans la nature du détergent employé, qui est le xylène sulfonate de sodium. Il présente l'avantage de précipiter complètement la fraction protéique dans une zone de pH beaucoup moins critique que le dodécyl sulfate préconisé par Kay, Simmons et Dounce.

CHAPITRE II

Méthodes d'études.

Pour étudier la structure des constituants nucléaires, notre méthode de travail a consisté à comparer les spectres d'un produit donné aussi intact que possible, dans différentes conditions, avec ceux d'un même produit altéré. Nous avons employé des méthodes d'altération principalement chimiques, en particulier l'action des détergents qui dénaturent la fraction protéique et celle de la désoxyribonucléase qui dépolymérise l'acide nucléique.

§ I. — **Appareillage.** — A) SPECTROGRAPHES. — Nous nous sommes intéressés essentiellement à la région spectrale, comprise entre 2 000 et 1 300 cm^{-1} , qui concerne les vibrations de valence des doubles liaisons $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{O}$.

(⁴³) E. R. M. KAY, N. S. SIMMONS et A. L. DOUNCE, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 1724.

(⁴⁴) N. S. SIMMONS, S. CHAVOS et H. K. ORBACH, *Federation Proc.*, 1952, **11**, 390.

Pour quelques expériences nous avons utilisé un spectrographe à simple faisceau construit au Laboratoire. L'optique de cet appareil est en fluorine.

Mais dans la plupart des cas le spectrographe était un Perkin Elmer à double faisceau, prisme de sel gemme.

L'avantage du double faisceau est triple :

— Il donne une courbe qui est indépendante de la valeur absolue de l'énergie reçue par la pile et qui exprime directement la valeur I/I_0 .

— Le faisceau de référence compense l'absorption de la vapeur d'eau et du gaz carbonique atmosphériques.

— Dans le cas où l'on examine un échantillon en solution, on place dans le faisceau de référence une cuve du solvant pour compenser l'absorption propre de ce dernier.

Ce troisième avantage est particulièrement intéressant dans les conditions où nous opérons et où le solvant utilisé est soit H_2O , soit D_2O . La figure 1 (*) montre que :

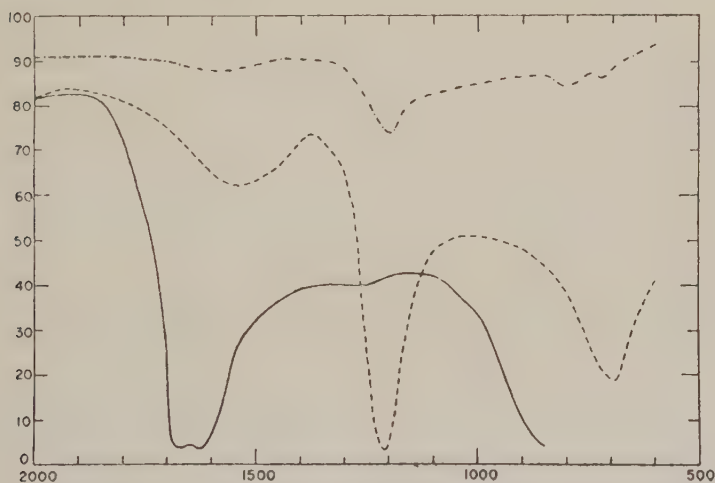


Fig. 1. — Transmission de l'eau ordinaire et de l'eau lourde sous une épaisseur de 0,025 cm.

— — — — — H_2O .
 - - - - - D_2O .
 - - - - - Compensation obtenue avec un spectrographe à double faisceau en plaçant une cuve de D_2O de 0,025 cm d'épaisseur sur le trajet de chaque faisceau.

(*) Cette figure est extraite d'un article de E. R. BLOUT et H. LENORMANT (*J. of Opt. Soc. of Am.*, 1953, **43**, n° 11) et nous a été aimablement communiquée par les auteurs.

a) L'eau lourde, en dehors de sa bande principale, à $1\,200\text{ cm}^{-1}$, a une absorption faible mais irrégulière. Il peut être difficile d'apprécier dans quelle mesure le spectre observé est fonction du solvant ou du matériel dissous.

b) Au-delà de $1\,350\text{ cm}^{-1}$, quel que soit le solvant utilisé, les courbes données par les spectrographes à simple faisceau sont médiocres et peu utilisables, les irrégularités d'absorption du solvant déformant les courbes.

Le double faisceau permet de compenser l'absorption propre de l'eau et de l'eau lourde. Toutefois il faut noter qu'à l'emplacement des bandes fortes vers $1\,600\text{ cm}^{-1}$ (H_2O) et $1\,200\text{ cm}^{-1}$ (D_2O) la sensibilité devient très mauvaise et aucune bande due à la substance dissoute ne peut être interprétée avec certitude.

§ II. — *Examen à l'état solide. Contrôle de l'hydratation.* — Pour obtenir un film, il suffit d'évaporer sur une lame une solution du produit à examiner.

Il s'est avéré très important d'étudier d'une part les effets du degré de l'hydratation des films, d'autre part ceux de la deutération de la substance à l'état solide.

Pour contrôler l'hydratation du produit, on monte la lame dans une enceinte close où l'hydratation est contrôlée par des solutions saturées de différents sels.

Si l'on désire deutérer le produit, on utilise des solutions dans l'eau lourde. L'expérience a montré que les films sont très suffisamment deutérés par la vapeur.

Pour une atmosphère d'humidité relative donnée, le degré d'hydratation du film peut être calculé au moyen des variations d'absorption dans la région de $3\,300\text{ cm}^{-1}$ (H_2O) ou de $2\,500\text{ cm}^{-1}$ (D_2O).

§ III. — *Examen en solution, gel ou suspension.* — A) CHOIX DU SOLVANT OU DU MILIEU DE SUSPENSION. — L'eau ordinaire présente à $1\,660\text{ cm}^{-1}$ une absorption intense qui, aux épaisseurs utilisées, est large et masque toute autre bande entre $1\,900$ et $1\,400\text{ cm}^{-1}$.

L'eau lourde a une bonne transparence dans cette région⁽⁴⁵⁾. Par contre elle donne lieu à une bande forte entre $1\,350$ et $1\,150\text{ cm}^{-1}$ qui a les mêmes inconvénients que la bande de l'eau ordinaire aux fréquences plus élevées.

Les régions d'opacité de chacun des deux solvants se placent précisément là où l'autre est relativement transparent (fig. 1).

Dans nos expériences, qui concernent essentiellement la région

⁽⁴⁵⁾ R. G. GORE, R. B. BARNES et E. M. PETERSEN, *Annal. Chem.*, 1949, **21**, 382.

comprise entre 2 000 et 1 300 cm^{-1} , nous avons par conséquent utilisé l'eau lourde.

B) PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS. — Les nucléoprotéines, quel que soit leur mode d'extraction, sont examinées en solution concentrée, à raison de 100 mg par centimètre cube. Dans l'eau et l'eau lourde, on obtient des gels fermes et translucides.

Dans le cas de la nucléohistone extraite par l'eau, il est certain que de telles solutions n'échappent pas à la critique que l'on peut faire à propos des solutions concentrées ⁽⁴⁶⁾, qui favorisent l'aggrégation des molécules. Mais du moins cette opération n'intervient-elle qu'au terme ultime et n'a-t-elle pas été répétée au cours de la préparation. Et surtout on a évité le retour en solution, qui dilacère le gel en molécules artificiellement agglutinées, et qui présente encore plus d'inconvénients.

La nucléohistone extraite par les sels a également été dissoute dans le NaCl 5M où elle forme une solution hautement visqueuse.

Les solutions sont examinées sous des épaisseurs allant de 1/100 à 3/100 de millimètre.

§ IV. — *Action des détergents et enzymes.* — A) ACTION DU XYLÈNE SULFONATE DE SODIUM. — Lorsqu'il est nécessaire de dénaturer la fraction protéique des DNP, nous utilisons l'action des détergents découverts par Anson ⁽⁴⁶⁾ ⁽⁴⁷⁾ et en particulier du xylène sulfonate de sodium. Ce dernier est fréquemment utilisé pour purifier le DNA de toute trace protéique ⁽⁴⁴⁾ ⁽⁴⁸⁾. Le détergent, suivant la concentration à laquelle il est employé, dénature la protéine soit en la précipitant, soit en la maintenant en solution ⁽⁴⁶⁾ ⁽⁴⁹⁾.

Si on ajoute à une solution ou à un gel de nucléoprotéine la quantité nécessaire de xylène sulfonate de sodium pour obtenir une concentration de 7,5 p. 100 les solutions précipitent, les gels deviennent opaques et pâteux. Avec 30 p. 100 de détergent, l'état des préparations n'est pas modifié.

Il a été vérifié que le xylène sulfonate utilisé ne présente pas de bande d'absorption gênante pour l'interprétation des résultats (voir III^e partie, chap. premier, § III-A).

B) ACTION DE LA DÉSOXYRIBONUCLÉASE (DNase). — Pour dépolymériser soit l'acide nucléique, soit la fraction nucléique des DNP, nous avons utilisé de la désoxyribonucléase en poudre provenant de la Worthington Biochemical Corporation (New Jersey U. S. A.).

⁽⁴⁶⁾ M. L. ANSON, *Science*, 1939, **90**, 256.

⁽⁴⁷⁾ M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 1939, **23**, 239.

⁽⁴⁸⁾ N. S. SIMMONS, Communication personnelle.

⁽⁴⁹⁾ P. W. PUTMAN, *Adv. in Prot. Chem.*, 1948, **4**, 79

Le critérium classique de la dépolymérisation du DNA est la diminution de viscosité des solutions ⁽⁵⁰⁾ ⁽⁵⁴⁾ ⁽⁵²⁾. Il suffit d'une trace d'enzyme pour liquéfier une solution même concentrée (10 p. 100) d'acide désoxyribonucléique.

Nous avons également fait agir la désoxyribonucléase sur différents gels de nucléoprotéine (à la concentration de 10 p. 100 de DNP).

DEUXIÈME PARTIE

ACIDE NUCLÉIQUE

Alors que la spectrographie ultra-violette a été appliquée depuis vingt ans à l'étude de l'acide nucléique, les premiers spectres infra-rouges datent de 1948 ⁽⁵³⁾ ⁽⁵⁴⁾ ⁽⁵⁵⁾. Un article de Fraser ⁽⁵⁶⁾ passe en revue les principales données obtenues par la spectrographie infra-rouge. Les études les plus complètes ont été faites par Blout et Fields, Blout et Lenormant, et par Fraser ^(53 à 61).

Blout et Lenormant ⁽⁵⁷⁾ ⁽⁵⁹⁾ ont signalé que l'acide désoxyribonucléique à l'état de haut polymère présente des différences spectrales selon qu'il est examiné à l'état sec ou en solution, alors que la courbe du bas polymère est identique dans les deux cas, mais sans approfondir cette question. Aussi avons-nous été amenés à préciser quelques résultats concernant l'effet de l'hydratation sur le haut polymère. Nous avons également étudié l'effet de la deutération et du pH sur le DNA altéré ou non.

§ I. — *Effet de l'hydratation* ⁽⁶²⁾. — A) RÉSULTATS. — Les films de haut polymère déshydratés (hydratation inférieure à 10 p. 100) présentent

⁽⁵⁰⁾ P. DE LA BLANCHARDIÈRE, *Z. Physiol. Chem.*, 1913, **87**, 291.

⁽⁵¹⁾ J. P. GREENSTEIN et W. W. JENNETTE, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1941, **9**, 236.

⁽⁵²⁾ D. MAZIA, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1941, **9**, 40.

⁽⁵³⁾ E. R. BLOUT et M. FIELDS, *J. Biol. Chem.*, 1948, **107**, 252.

⁽⁵⁴⁾ E. R. BLOUT et M. FIELDS, *J. Biol. Chem.*, 1949, **178**, 355.

⁽⁵⁵⁾ I. M. KLOTZ, P. GRISWOLD et D. M. GRUEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 1615.

⁽⁵⁶⁾ R. D. B. FRASER, *Progr. in Biophys. and Biophys. Chem.*, 1953, **3**, 47.

⁽⁵⁷⁾ E. R. BLOUT et H. LENORMANT, *J. Opt. Soc. Am.*, 1953, **43**, n° 11, 1093.

⁽⁵⁸⁾ E. R. BLOUT et H. LENORMANT, *C. R.*, 1954, **239**, 1281.

⁽⁵⁹⁾ E. R. BLOUT et H. LENORMANT, *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **17**, 303 et 325.

⁽⁶⁰⁾ R. D. B. FRASER et J. CHAYEN, *Exptl. Cell Research*, 1952, **3**, 492.

⁽⁶¹⁾ M. J. FRASER et R. D. B. FRASER, *Nature*, 1951, **167**, 761 ; **170**, 491.

⁽⁶²⁾ H. LENORMANT et C. DE LOZÉ, *Bull. Soc. Chim.*, 1955, 1327.

trois bandes à 1609 (moyenne), 1655 (très forte) et 1692 cm^{-1} (forte) (fig. 2, courbe 4).

Lorsque le film est exposé 12 heures à une atmosphère où l'humidité relative est de 95 p. 100, la bande de 1692 cm^{-1} se déplace à 1708 cm^{-1} (fig. 2, courbe 1).

Si on opère avec le bas polymère, on obtient deux courbes superposables.

Les modifications spectrales du haut polymère sont réversibles. Un film hydraté reprend les caractéristiques du film sec si on le laisse séjourner en présence de P_2O_5 . On peut à nouveau l'hydrater et constater les transformations correspondantes.

On peut également réaliser une hydratation progressive et observer le spectre à des stades intermédiaires. Dans la figure 2 la courbe 3 est obtenue après exposition à une atmosphère de 30 p. 100 d'humidité relative, la courbe 2 après exposition à une atmosphère de 50 p. 100 d'humidité relative.

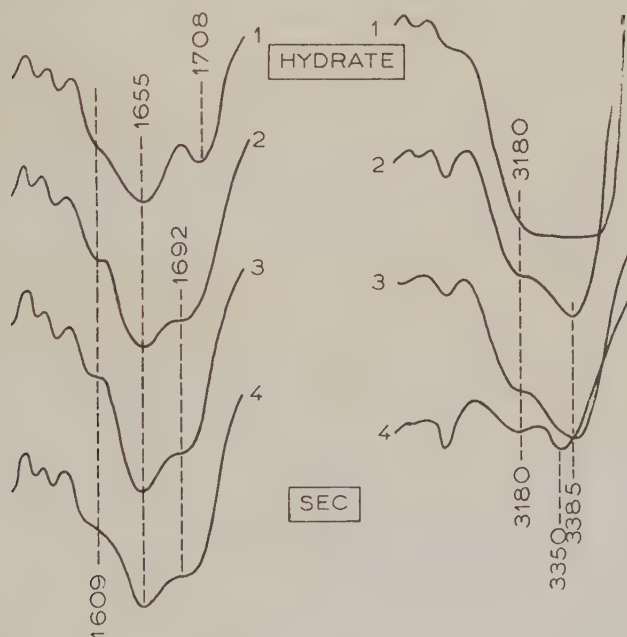


Fig. 2. — Acide désoxyribonucléique, haut polymère.
Dessiccation progressive d'un film.

- 1 : Film exposé à une atmosphère à 100 p. 100 d'humidité relative.
- 2 : Film 1 exposé à une atmosphère à 50 p. 100 d'humidité relative.
- 3 : Film 2 exposé à une atmosphère à 30 p. 100 d'humidité relative.
- 4 : Film 3 exposé à une atmosphère à moins de 10 p. 100 d'humidité relative.

Si l'on compare les absorptions dans la région de 3300 cm^{-1} (due à H_2O) (*), on constate que le type de spectre correspondant au film hydraté apparaît seulement quand la teneur en eau de ce film est très élevée. Il est possible d'évaluer grossièrement à quel degré d'hydratation se fait la transformation.

On peut observer que la courbe 2 de la figure 2, très voisine de celle obtenue après forte déshydratation, présente déjà une légère augmentation de l'absorption à 1692 cm^{-1} par rapport aux courbes 3 et 4. Il est donc probable que les modifications du spectre commencent à apparaître dans les conditions où se trouve le film 2 et sont complètes dans les conditions du film 1.

D'après l'intensité relative de l'absorption des films 1 et 2 dans la région de 3300 cm^{-1} , on calcule que le film 1 contient une fois et demie plus d'eau que le film 2. Ces données sont en concordance avec les variations pondérales de l'échantillon exposé aux mêmes changements d'humidité relative. Ces différents résultats permettent d'évaluer la quantité d'eau contenue dans le film 2 à 50 p. 100 et dans le film 1 à 150 p. 100 de matériel complètement sec.

La transformation spectrale se produit donc pour une teneur en eau voisine de 50 p. 100.

B) DISCUSSION. — Il est intéressant de discuter ces résultats en fonction des hypothèses de structure élaborées à l'aide des clichés de rayons X. Les plus anciennes (⁶³ à ⁷¹) sont actuellement abandonnées. Mais les théories récentes (⁷² à ⁷⁵), en particulier celles de Franklin et Gosling (⁷³) (^{73 bis}), font état de variations de diffraction des rayons X qui surviennent dans des conditions analogues à celles que nous avons

(*) La plupart des auteurs (⁶⁴) (⁶⁵) attribuent l'absorption dans cette région aux groupements NH et OH. En fait, nous avons montré (⁶²) qu'elle semble plutôt due à l'eau contenue dans la préparation. Les échantillons secs ont des bandes très faibles qui peuvent correspondre aussi bien à un reliquat d'eau qu'aux groupements NH et OH.

(⁶³) W. T. ASTBURY, *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, 1947, **1**, Nucleic Acid.

(⁶⁴) W. T. ASTBURY et F. O. BELL, *Nature*, 1938, **141**, 747.

(⁶⁵) W. T. ASTBURY et F. O. BELL, *Nature*, 1941, **147**, 696.

(⁶⁶) W. T. ASTBURY et F. O. BELL, *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, 1951, **1**, 66.

(⁶⁷) S. FURBERG, *Nature*, 1949, **164**, 22.

(⁶⁸) S. FURBERG, *Acta Crystal.*, 1950, **3** 325.

(⁶⁹) S. FURBERG, *Acta chem. Scand.*, 1952, **6**, 634.

(⁷⁰) L. PAULING et R. B. COREY, *Nature*, 1953, **171**, 346.

(⁷¹) L. PAULING et R. B. COREY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1953, **39**, 84.

(⁷²) S. D. WATSON et F. H. C. CRICK, *Nature*, 1953, **171**, 737 et 964.

(⁷³) R. E. FRANKLIN et R. G. GOSLING, *Acta Crystal.*, 1953, **6**, 173 et 678.

(^{73 bis}) R. E. FRANKLIN et R. G. GOSLING, *Nature*, 1953, **171**, 740 ; **172**, 156.

(⁷⁴) M. H. F. WILKINS, A. R. STOKES et H. R. WILSON, *Nature*, 1953, **171**, 738.

(⁷⁵) M. H. F. WILKINS, W. E. SEEDS, A. R. STOKES et H. R. WILSON, *Nature*, 1953, **172**, 759.

observées. D'après ces auteurs, le DNA exposé à une atmosphère dont l'humidité relative est de 92 p. 100 est en structure B, il passe en structure A si l'humidité relative passe à 75 p. 100. Le changement est réversible si la déshydratation n'est pas poussée trop loin. La teneur en eau de l'échantillon est évaluée à 50 p. 100 au moment où apparaît la forme A. Elle correspond à celle que nous avons calculée pour la transformation spectrale. Il semble donc normal d'attribuer la bande infra-rouge $1\ 692\text{ cm}^{-1}$ à la structure A et la bande $1\ 708\text{ cm}^{-1}$ à la structure B.

Toutefois Franklin et Gosling⁽⁷³⁾ ont remarqué que les fibres de DNA ne donnent un diagramme de rayons X caractéristique de la forme A que dans des limites assez critiques d'hydratation. L'optimum correspond à 75 p. 100 d'humidité relative. Pour moins de 60 p. 100 la structure de l'acide nucléique est plus ou moins désorganisée et ne correspond plus finalement ni à la forme A, ni à la forme B.

La bande infra-rouge $1\ 692\text{ cm}^{-1}$, que nous attribuons à la structure A, persiste pour une humidité relative très faible. En outre, elle se rencontre dans les spectres du bas polymère et du haut polymère altéré. Dans les expériences effectuées avec le haut polymère intact, nous avons vu que le retour à la forme B restait possible après un séjour de 12 heures en présence de P_2O_5 . Cette réversibilité implique qu'une partie importante du DNA n'est pas dégradée ni dépolymérisée par dessiccation et se trouve donc en structure A. La persistance de cette structure pour une humidité relative inférieure à 10 p. 100 est en discordance avec la limite de 60 p. 100 indiquée par Franklin et Gosling.

Cette discordance tient vraisemblablement à certaines différences entre les techniques employées.

Tout d'abord la forme de l'échantillon influe sur ses capacités d'hydratation. Les fibres utilisées pour la diffraction des rayons X sont de dimensions réduites et se mettent sans doute rapidement en équilibre avec l'atmosphère. Les films destinés à la spectrographie infra-rouge sont relativement épais et probablement capables de retenir une certaine proportion d'eau même en atmosphère sèche : après un séjour de 12 heures en présence de P_2O_5 , le spectre du DNA présente encore une absorption notable dans la région de $3\ 300\text{ cm}^{-1}$. Cette petite quantité d'eau peut suffire à maintenir une partie du film en structure A et faciliter son retour en structure B quand on le réhydrate.

En second lieu la qualité d'un diagramme de rayons X dépend non seulement de la structure interne des molécules, mais encore de leur arrangement en cristal. Lorsque le DNA est desséché, il passe plus ou moins à l'état amorphe et ne donne pas de cliché de rayons X lisible. Par contre l'absorption infra-rouge dépend uniquement de la structure interne, elle est semblable pour les portions cristallines et amorphes de l'échantillon et par suite ne se trouve pas notablement modifiée par une désorganisation cristallographique.

Ainsi malgré ces discordances, nous croyons pouvoir maintenir que la bande $1\,708\text{ cm}^{-1}$ caractérise la structure B et que la bande $1\,692\text{ cm}^{-1}$ caractérise une structure hélicoïdale de type A, que cette structure soit présente dans une phase amorphe ou dans une phase cristalline susceptible de donner des diagrammes de rayons X, à condition toutefois que la bande $1\,708\text{ cm}^{-1}$ reparaisse par hydratation.

Il est difficile de préciser l'origine des transformations spectrales observées, en particulier du changement de fréquence $1\,692\text{--}1\,708\text{ cm}^{-1}$.

On ne peut guère admettre qu'elles sont dues à une simple hydratation des bases puriques et pyrimidiques. En effet, le bas polymère s'hydrate sans que sa courbe d'absorption soit modifiée.

Franklin ⁽⁷⁶⁾ avait suggéré qu'à l'état sec (forme A) certains NH_2 se rapprochent suffisamment des phosphates pour qu'une liaison hydrogène s'établisse entre les deux groupements. Cette liaison serait détruite par l'écartement des chaînes lors de l'hydratation. Mais cette explication n'est pas très satisfaisante car le spectre observé à l'état sec est indépendant de la configuration très particulière de la forme A : on le retrouve si le DNA est altéré ou dépolymérisé, ce qui lui donne vraisemblablement une structure différente.

Comme l'avaient fait remarquer Blout et Lenormant ⁽⁵⁹⁾, l'analogie spectrale entre le haut polymère déshydraté et les échantillons dépolymérisés ou altérés suggère que dans tous les cas les bases puriques et pyrimidiques sont associées par les mêmes systèmes de liaisons hydrogènes. Seul le spectre du haut polymère hydraté est particulier. La signification des changements spectraux observés est donc à chercher dans les phénomènes qui accompagnent l'hydratation du produit natif.

On peut penser que la déformation de la structure hélicoïdale par hydratation perturbe les liaisons hydrogènes qui, en unissant les bases puriques et pyrimidiques, assurent la stabilité du système. La variation de fréquence qui accompagne le passage de l'état sec à l'état humide, et qui va dans le sens d'une augmentation de fréquence, suggère un relâchement des liaisons hydrogènes lors de l'hydratation. Ce relâchement implique une augmentation de la distance entre les bases, et peut-être des réarrangements de densité électronique.

§ II. — *Effet de la deutération* ⁽⁶²⁾. — A) RÉSULTATS. — Le film hydraté (humidité 95 p. 100) du haut polymère présente trois bandes à $1\,708\text{ cm}^{-1}$ (forte), $1\,655\text{ cm}^{-1}$ (très forte), $1\,609\text{ cm}^{-1}$ (moyenne) (fig. 2, courbe 1). Si l'hydratation est réalisée avec de l'eau lourde, on obtient une courbe un peu différente, dont les sommets sont à $1\,680\text{ cm}^{-1}$ (intense), $1\,650\text{ cm}^{-1}$ (très intense), $1\,622\text{ cm}^{-1}$ (moyen) et $1\,575\text{ cm}^{-1}$ (moyen) (fig. 3, courbe 1).

⁽⁷⁶⁾ R. E. FRANKLIN, Communication personnelle.

L'effet de la deutération paraît être de déplacer la bande 1708 à 1680 cm^{-1} , la bande 1609 à 1622 cm^{-1} , et de faire apparaître une bande à 1575 cm^{-1} qui semble être due à la guanidine⁽⁵⁹⁾. La bande 1655 cm^{-1} n'est pas modifiée.

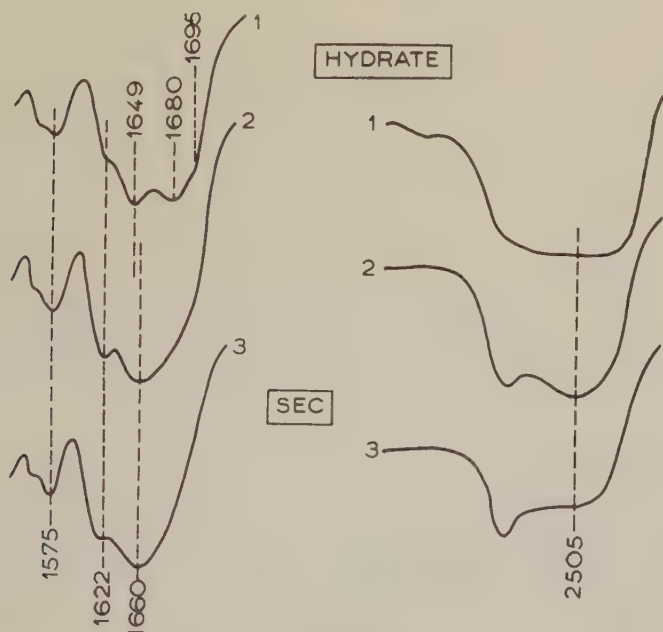


Fig. 3. — Acide désoxyribonucléique, haut polymère deutéré.
Dessiccation progressive d'un film.

- 1 : Film exposé à une atmosphère à 100 p. 100 d'humidité relative.
- 2 : Film 1 exposé à une atmosphère à 50 p. 100 d'humidité relative.
- 3 : Film 2 exposé à une atmosphère à moins de 10 p. 100 d'humidité relative.

On notera qu'à côté du maximum à 1680 cm^{-1} , il existe un épaulement au voisinage de 1695 cm^{-1} , visible seulement si le spectre est enregistré à faible vitesse. A vitesse plus rapide, il peut ne pas apparaître : c'est ainsi qu'il a échappé à l'attention de Blout et Lenormant⁽⁵⁹⁾. On peut se demander si cet épaulement n'est pas dû à un reste de matériel non deutéré. Il représenterait alors la bande 1708 cm^{-1} en partie masquée par l'absorption voisine. Mais de nombreuses courbes enregistrées dans des conditions où la deutération était complète présentent toujours cette bande. Elle appartient donc bien au spectre du haut polymère deutéré. Nous attirons l'attention sur le fait que la bande décrite habituellement sous le nom de bande 1680 cm^{-1} repré-

sente en réalité une absorption assez large qui s'étend de $1\,695$ à $1\,680\text{ cm}^{-1}$, nous verrons ultérieurement l'intérêt de cette remarque.

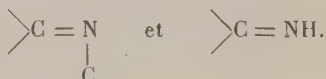
Si on examine les échantillons déshydratés (humidité inférieure à 10 p. 100) on observe, pour le film normal, trois bandes à $1\,692\text{ cm}^{-1}$ (forte), $1\,655\text{ cm}^{-1}$ (très forte) et $1\,609\text{ cm}^{-1}$ (moyenne), et pour le film deutéré trois bandes à $1\,660\text{ cm}^{-1}$ (très forte), $1\,622\text{ cm}^{-1}$ (forte) et $1\,575\text{ cm}^{-1}$ (moyenne) (fig. 2 et 3, courbe 3). On retrouve le déplacement de la bande $1\,609$ à $1\,622\text{ cm}^{-1}$ et l'apparition de la bande $1\,575\text{ cm}^{-1}$ (guanidine) signalée ci-dessus. Mais le phénomène le plus apparent semble être la disparition de l'absorption à $1\,692\text{ cm}^{-1}$. En réalité, il ne s'agit pas d'une disparition mais d'un déplacement. En effet, la bande $1\,660\text{ cm}^{-1}$ du haut polymère deutéré paraît formée de deux composantes dont l'une se déplace à $1\,680\text{ cm}^{-1}$ lors de l'hydratation par la vapeur d'eau lourde et représente la même vibration que la bande $1\,692\text{ cm}^{-1}$ du produit non deutéré. Par conséquent la deutération aurait pour effet non pas de faire disparaître la bande $1\,692\text{ cm}^{-1}$ mais de la déplacer vers $1\,660\text{ cm}^{-1}$ (déplacement de 32 cm^{-1} vers les fréquences plus basses) où elle vient fusionner avec une bande non affectée par la substitution.

B) DISCUSSION. — Les modifications spectrales produites par la deutération sont délicates à interpréter.

Rappelons que les bandes de cette région caractérisent l'absorption de certains groupements des bases puriques et pyrimidiques. La position des sommets permet de penser qu'il s'agirait des vibrations de valence des :



On peut avoir pour ce dernier groupement deux dispositions :



Il paraît évident que les groupements $\diagup \text{C}=\text{O}$ et $\diagup \text{C}=\text{N}$ ne peuvent être perturbés par la deutération puisqu'ils ne comportent pas d'hydrogène échangeable. La modification affecterait donc le groupement $\diagup \text{C}=\text{NH}$.

Pour calculer grossièrement le changement de fréquence introduit dans la vibration de $\diagup \text{C}=\text{NH}$ quand on substitue le deutérium à l'hydrogène, il est nécessaire de faire deux approximations.

La première consiste à admettre qu'une bande infra-rouge représente la vibration d'un groupement isolé, la seconde que l'oscillation de deux atomes autour de leur position d'équilibre, sous l'influence des forces

de valence existant entre les deux atomes, obéit à la loi de Hooker. La fréquence ν de la vibration est alors donnée par la formule :

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

où :

c représente la vitesse de la lumière,
 k une constante de force entre les deux atomes,
 μ la masse réduite,

($\mu = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2}$ si m_1 et m_2 sont les masses respectives des atomes).

On peut utiliser cette formule en appelant :

ν_H la fréquence du groupement >C=NH ,

ν_D la fréquence du groupement >C=ND ,

μ_H, μ_D les masses réduites dans les deux cas.

On établit alors le rapport :

$$\frac{\nu_H}{\nu_D} = \sqrt{\frac{\mu_D}{\mu_H}} \quad \mu_H = 6,66 \quad \mu_D = 6,85$$

$$\frac{\nu_H}{\nu_D} = 1,01.$$

Ce résultat permet alors de calculer le déplacement d'une bande.

Si l'on considère, par exemple, que la bande 1692 cm^{-1} du produit déshydraté représente la vibration de C=NH , on trouve pour la vibration de C=ND la valeur :

$$\nu_D = \frac{\nu_H}{1,01} = \frac{1692}{1,01} = 1665 \text{ cm}^{-1}.$$

Cette valeur calculée est évidemment assez voisine de la valeur expérimentale 1660 cm^{-1} , aux erreurs d'approximation et d'étalonnage près.

Le même calcul appliqué à la bande 1708 du produit hydraté donne un déplacement à 1690 cm^{-1} (au lieu de 1680 cm^{-1} expérimental).

Il paraît néanmoins très artificiel de vouloir attribuer une bande de cette région à la vibration d'un groupement isolé, et il est probable que la concordance entre le calcul et l'expérience n'est que fortuite.

En effet, les doubles liaisons des noyaux puriques et pyrimidiques sont fortement conjuguées. En outre les bases elles-mêmes sont engagées dans une structure complexe où elles voisinent avec d'autres groupements. Dans ces conditions, des interactions interviennent entre deux vibrations voisines. Si elles ont les mêmes propriétés de symétrie, les fréquences s'écartent. Si les types de symétrie sont différents, on

observe une seule fréquence et on dit que les vibrations subissent une dégénérescence accidentelle. De toute façon, la fréquence de la vibration prend une valeur qui s'écarte probablement de celle observée pour un groupement isolé. Dans ce cas, il devient extrêmement délicat de préciser les perturbations qui surviennent lorsque la masse réduite d'un des atomes est modifiée, et par conséquent de prévoir les effets de la deutération.

A l'appui de ces remarques, nous pouvons signaler le comportement apparemment aberrant de la bande $1\,609\text{ cm}^{-1}$ du produit non deutéré. Après deutération, elle se déplace vers les fréquences plus élevées ($1\,622\text{ cm}^{-1}$), c'est-à-dire en sens inverse du déplacement normalement prévu.

On peut donc penser que les bandes situées entre $1\,600$ et $1\,710\text{ cm}^{-1}$ représentent des vibrations complexes de l'ensemble des noyaux puriques et pyrimidiques. Dans ces conditions les changements spectraux amenés par deutération sont impossibles à interpréter actuellement.

§ III. — *Étude en infra-rouge polarisé.* — Le film hydraté présente un fort dichroïsme perpendiculaire pour toutes les bandes de cette région et particulièrement important pour la bande $1\,708\text{ cm}^{-1}$ (fig. 4 a). Le dichroïsme disparaît lorsqu'on déshydrate le film (fig. 4 b).

Le dichroïsme du film hydraté indique, comme l'avaient montré Fraser et Fraser ⁽⁵⁶⁾ ⁽⁶⁰⁾ ⁽⁶¹⁾, que le plan des bases est approximativement perpendiculaire à l'axe de la fibre. Cette disposition correspond à celle imaginée dans le modèle de la structure B qui existe pour une forte humidité.

L'absence de dichroïsme après déshydratation montre que le plan des bases est alors incliné sur l'axe de la fibre. Ce résultat est en accord avec le modèle proposé pour la structure A.

Par conséquent le dichroïsme dans l'infra-rouge confirme les données des rayons X sur la transformation de structure $B \rightarrow A$ (*).

§ IV. — *Considérations et conclusions relatives à la bande $1\,692\text{ cm}^{-1}$.* — Nous verrons plus loin que, si l'on examine la nucléohistone de thymus, le spectre de l'acide nucléique se trouve en grande partie masqué par des bandes dues à la fraction protéique de la molécule. Cependant, une bande reste en dehors de la région d'absorption de l'histone et permet par conséquent de suivre les modifications éventuelles de la fraction nucléique au cours des expériences : la bande $1\,692\text{ cm}^{-1}$ du haut polymère sec qui passe à $1\,708\text{ cm}^{-1}$ lors de l'hydratation.

(*) Un récent article de SUTHERLAND ⁽⁷⁷⁾ indique des résultats analogues.

(77) G. B. B. M. SUTHERLAND et M. TSCROI, *Proc. Roy. A. G. B.*, 1957, **239**, n° 1219, 446.

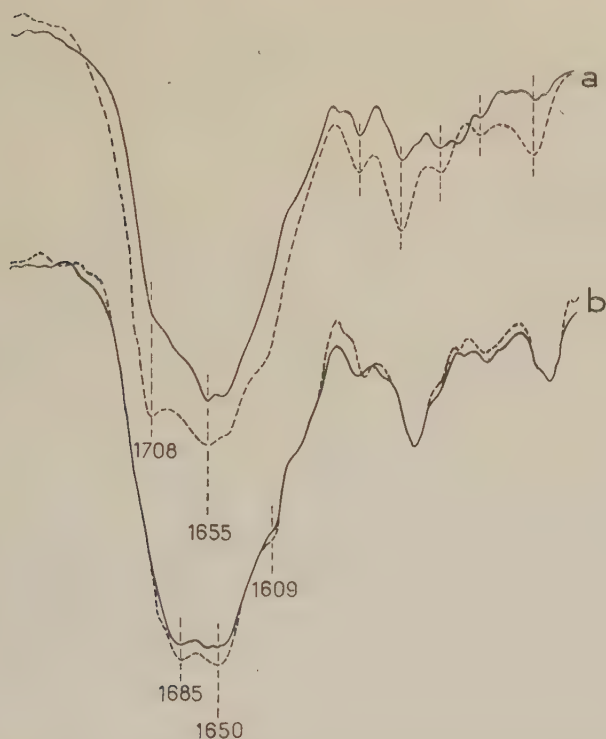


Fig. 4. — Acide désoxyribonucléique. Films orientés.

a : Film exposé à une atmosphère à 95 p. 100 d'humidité relative.

b : Film exposé à une atmosphère à moins de 10 p. 100 d'humidité relative.

Courbes en traits pleins : Vecteur parallèle à la direction d'étirement.

Courbes en pointillé : Vecteur perpendiculaire à la direction d'étirement.

C'est pourquoi il est intéressant, en s'appuyant sur les modifications spectrales produites par la deutération et l'hydratation, de dégager quelques conclusions relatives à cette bande.

Comme nous l'avons vu à propos de la deutération, les bandes de cette région ne représentent pas les vibrations de groupements isolés mais des vibrations complexes de l'ensemble des noyaux puriques et pyrimidiques, où les doubles liaisons sont fortement conjuguées.

On peut observer que la position de la bande pour le film humide ne correspond en aucun cas à une des fréquences observées lors des variations de pH ⁽⁷⁸⁾. Par suite il ne semble pas que les effets de l'hydrata-

⁽⁷⁸⁾ H. LENORMANT et C. DE LOZÉ, *Bull. Soc. Chim.*, 1955, 1051.

tion relèvent des transpositions tautomériques, telles qu'en entraînant l'acidification et l'alcalinisation du milieu. La bande perturbée semble plutôt appartenir au spectre relatif à la structure en milieu neutre.

Pour expliquer cette perturbation, il paraît plus vraisemblable de faire appel à l'action des liaisons hydrogènes, comme nous l'avons suggéré au § I.

Pratiquement, il reste un fait expérimental bien établi : en milieu non deutéré, la bande 1692 cm^{-1} caractérise soit le bas polymère, soit le haut polymère en forme A ; elle ne présente pas de dichroïsme. La bande 1708 cm^{-1} caractérise le haut polymère en forme B, elle présente un dichroïsme perpendiculaire. En milieu deutéré, la bande $1680\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$ est propre au haut polymère en forme B ; le haut polymère en forme A et le bas polymère ne possèdent pas d'absorption entre 1680 et 1710 cm^{-1} mais, comme nous l'avons vu, une bande à 1660 cm^{-1} .

Résumé et conclusion.

La figure 5 représente les principales bandes de l'acide désoxyribonucléique dans toutes les conditions où nous l'avons observé, ainsi que les déplacements relatifs des bandes lorsque ces conditions varient.

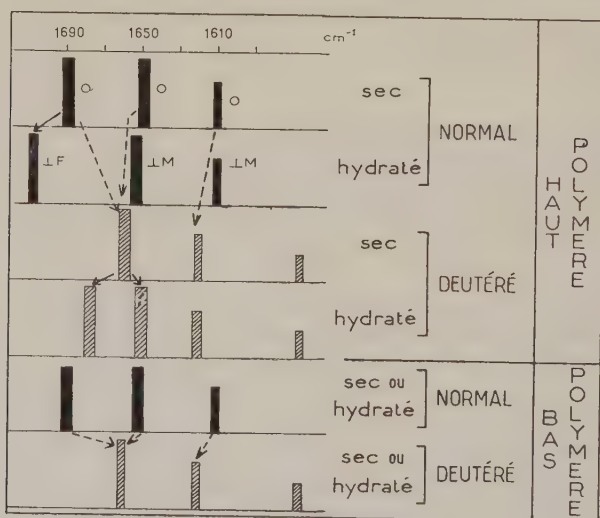


Fig. 5. — Acide désoxyribonucléique. Tableau des principales bandes.

$\perp M$: Dichroïsme perpendiculaire fort.

$\perp F$: Dichroïsme perpendiculaire moyen.

$\rightarrow$: Effet de l'hydratation.

$\dashrightarrow$: Effet de la deutération.

Les différences entre le haut et le bas polymère apparaissent lorsque l'échantillon est hydraté. Le spectre du haut polymère comporte deux bandes fortes à $1\,708$ et $1\,650\text{ cm}^{-1}$ et une bande moyenne à $1\,609\text{ cm}^{-1}$. Lorsque le film est orienté, on observe un dichroïsme perpendiculaire fort pour les bandes $1\,708$ et $1\,650\text{ cm}^{-1}$, moyen pour la bande $1\,609\text{ cm}^{-1}$.

Le spectre du bas polymère comporte deux bandes fortes à $1\,692$ et $1\,650\text{ cm}^{-1}$ et une bande moyenne à $1\,609\text{ cm}^{-1}$. Il n'y a pas de dichroïsme en infra-rouge polarisé.

Après déshydratation des films, l'absorption du bas polymère ne se modifie pas. Dans le spectre du haut polymère, la bande $1\,708\text{ cm}^{-1}$ passe à $1\,692\text{ cm}^{-1}$, et le spectre devient semblable à celui du bas polymère. La dichroïsme en lumière polarisée disparaît.

Sous l'effet de la deutération, les spectres des films hydratés subissent les modifications suivantes : dans le cas du haut polymère, la bande $1\,708$ passe à $1\,680\text{ cm}^{-1}$, la bande $1\,609$ à $1\,622\text{ cm}^{-1}$, une bande apparaît à $1\,575\text{ cm}^{-1}$, l'absorption à $1\,650\text{ cm}^{-1}$ demeure inchangée. Dans le cas du bas polymère, les déplacements sont analogues, mais pour une bande les fréquences sont différentes : la bande $1\,692\text{ cm}^{-1}$ vient fusionner avec la bande $1\,650\text{ cm}^{-1}$, en donnant un seul sommet à $1\,660\text{ cm}^{-1}$.

L'effet de la deutération sur les films secs est identique pour le haut et le bas polymère. On obtient un spectre semblable à celui du bas polymère deutéré hydraté.

TROISIÈME PARTIE

PROTÉINES

La structure des protéines a tout d'abord été étudiée au moyen des clichés de rayons X ^(79 a 81). On sait que la chaîne peptidique peut se présenter sous deux formes, que l'on désigne sous le nom de forme α

⁽⁷⁹⁾ R. O. HERZOG et W. JANCKE, *Naturwissenschaften*, 1921, **4**, 928 et **14**, 1223.

⁽⁸⁰⁾ R. O. HERZOG et W. JANCKE, *Fest Chr. Kaiser Wilhelm Ges.* (Berlin), 1921, 118.

⁽⁸¹⁾ K. H. MEYER et H. MARK, *Ber.*, 1928, **61** B, 1932.

⁽⁸²⁾ R. S. BEAR et H. J. HUGO, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1951, **53**, 627.

⁽⁸³⁾ J. C. KENDREW, *The Proteins* (Neurath et Bayley), 1953, vol. **2** B, Academic Press Inc. Publishers, New York.

⁽⁸⁴⁾ W. T. ASTBURY et A. STREET, *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, 1931, A **230**, 75.

et forme β . De nombreux modèles d'unités cellulaires ont été imaginés. Les plus récents et les plus probables sont, pour la forme β , la « parallel pleated-sheet » et l'« anti-parallel pleated-sheet » de Pauling et Corey ⁽⁸⁵⁾, pour la forme α , l'« α -helix » de Pauling et Corey ⁽⁸⁵⁾ ⁽⁸⁶⁾ et les structures en cycles proposées par plusieurs auteurs ⁽⁶⁶⁾ ⁽⁸⁷⁾ ⁽⁸⁸⁾ ⁽⁸⁹⁾.

La spectrographie infra-rouge a permis de préciser la structure de la liaison peptidique ^(90 à 107). En corrélation avec les données fournies par les clichés de rayons X, on a pu établir que les protéines α et les protéines β possèdent deux types de spectres très différents, qui se distinguent par la position et le dichroïsme des bandes amide I et amide II ^(89 à 94). Cette distinction a permis à Ambrose et Elliott et à Lenormant d'étudier en détail la dénaturation des protéines ⁽⁹⁴⁾ ⁽¹⁰²⁾ ⁽¹⁰⁷⁾. Des résultats récents suggèrent qu'il existe plusieurs types de forme α et de forme β ^(99 à 101) ⁽¹⁰⁸⁾ ⁽¹⁰⁹⁾.

⁽⁸⁵⁾ L. PAULING, R. B. COREY et H. R. BRANSON, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1951, **37**, 205, 241, 251, 260, 720.

⁽⁸⁶⁾ B. W. LOW et R. B. BAYBUTT, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 5806.

⁽⁸⁷⁾ S. MIZUSHIMA, T. SIMANOUTI, M. TSUBOI, T. SUGITA et E. KATO, *Nature*, 1949, **164**, 918.

⁽⁸⁸⁾ T. SIMANOUTI et S. MIZUSHIMA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1948, **51**, 1.

⁽⁸⁹⁾ C. H. BAMFORD, W. E. HANBY et F. HAPPEY, *Proc. Roy. Soc.*, 1951, A **205**, 30 et A **206**, 407.

⁽⁹⁰⁾ E. J. AMBROSE et A. ELLIOTT, *Proc. Roy. Soc.*, 1951, A **205**, 47 ; A **206**, 206 ; A **208**, 75.

⁽⁹¹⁾ E. J. AMBROSE, A. ELLIOTT et R. B. TIMPLE, *Nature*, 1949, **163**, 859.

⁽⁹²⁾ E. J. AMBROSE et W. E. HANBY, *Nature*, 1949, **163**, 483.

⁽⁹³⁾ A. ELLIOTT et E. J. AMBROSE, *Nature*, 1950, **165**, 921 ; **166**, 294.

⁽⁹⁴⁾ A. ELLIOTT et E. J. AMBROSE, *Proc. Roy. Soc. London*, 1951, A **206**, 206 ; A **208**, 75.

⁽⁹⁵⁾ J. T. EDSALL, *J. Chem. Phys.*, 1936, **4**, 1.

⁽⁹⁶⁾ J. T. EDSALL, *J. Chem. Phys.*, 1936, **5**, 225.

⁽⁹⁷⁾ J. T. EDSALL, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1938, **6**, 40.

⁽⁹⁸⁾ J. T. EDSALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 1943, **65**, 1767.

⁽⁹⁹⁾ H. LENORMANT, *Trans. Far. Soc.*, 1956, **52**, n° 400, part IV, fig. 2.

⁽¹⁰⁰⁾ H. LENORMANT et E. R. BLOUT, *Bull. Soc. Chim.*, 1954, 859.

⁽¹⁰¹⁾ H. LENORMANT et E. R. BLOUT, *Nature*, 1957, **179**, 960.

⁽¹⁰²⁾ H. LENORMANT et J. CHOUTEAU, *J. de Physiol.*, 1950, **42**, 640.

⁽¹⁰³⁾ H. LENORMANT, *C. R.*, 1945, **221**, 58 et 545.

⁽¹⁰⁴⁾ H. LENORMANT, *C. R.*, 1947, **224**, 1219.

⁽¹⁰⁵⁾ H. LENORMANT, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1948, **15**, 33.

⁽¹⁰⁶⁾ H. LENORMANT, *Thèse de Sciences*, 1950, Masson et Cie, éd.

⁽¹⁰⁷⁾ H. LENORMANT, *Bull. Soc. Chim.*, 1953, 214.

⁽¹⁰⁸⁾ P. DOTY, A. WADA, JEN TSI YANG et E. R. BLOUT, *J. of Polymer. Sc.*, 1957, **23**, 851.

⁽¹⁰⁹⁾ E. R. BLOUT et H. LENORMANT, *Nature*, 1957, **179**, 960.

CHAPITRE PREMIER

Histone.

§ 1. — *Etude des films secs de différents échantillons.* — A) RÉSULTATS. — Nous avons étudié, sous forme de films secs, plusieurs échantillons d'histone, qui ont été préparés par des procédés différents, et que nous avons appelés histone *a*, histone *b*, histone *c* et histone *d* (Pour les détails de préparation, se reporter à la 1^{re} partie, chap. premier, § II-B).

Les courbes comportent (fig. 6) :

— une bande large et forte vers $1\,535\text{ cm}^{-1}$;

— une absorption très forte dans la région de $1\,650\text{ cm}^{-1}$, donnant lieu à une ou plusieurs bandes suivant les échantillons.

L'histone *a* présente une bande forte à $1\,660\text{ cm}^{-1}$ et une bande presque aussi forte à $1\,630\text{ cm}^{-1}$ (courbe 1).

L'histone *b* possède également deux bandes à $1\,660$ et $1\,630\text{ cm}^{-1}$, mais cette dernière est moins intense que dans le cas de l'histone *a* (courbe 2).

L'histone *c* et l'histone *d* présentent une seule bande à $1\,660\text{ cm}^{-1}$ (courbe 3).

Nous avons fait agir le xylène sulfonate de sodium sur ces différentes histones.

Dans le cas des histones *c* et *d*, l'action du détergent fait apparaître une forte bande à $1\,625\text{ cm}^{-1}$ (courbe 4'). Dans les autres, elle se traduit par une augmentation notable de la bande $1\,630\text{ cm}^{-1}$ dont le sommet se déplace à $1\,625\text{ cm}^{-1}$ (courbe 1').

Il a été vérifié que le xylène sulfonate de sodium n'a pas d'absorption importante dans cette région (voir IV^e partie, chap. premier, § III-A).

B) Discussion. — Les bandes de cette région sont caractéristiques de l'absorption de la liaison peptidique. On sait que la bande amide I est située vers $1\,650\text{ cm}^{-1}$ ou vers $1\,625\text{ cm}^{-1}$ selon que la protéine est en forme α ou β (⁸⁹ à ⁹⁴).

Les histones *c* et *d*, qui présentent une seule bande à $1\,655\text{ cm}^{-1}$, correspondent à une protéine totalement en forme α . La forme β n'apparaît qu'après dénaturation par le xylène sulfonate.

Par contre, dans les histones *a* et *b*, qui présentent deux bandes, on a sans doute affaire à un mélange des deux formes, avec prédominance de la forme α . La proportion de forme β augmente lorsqu'on fait agir le xylène sulfonate.

Il semble donc que, parmi les différents modes de préparation utili-

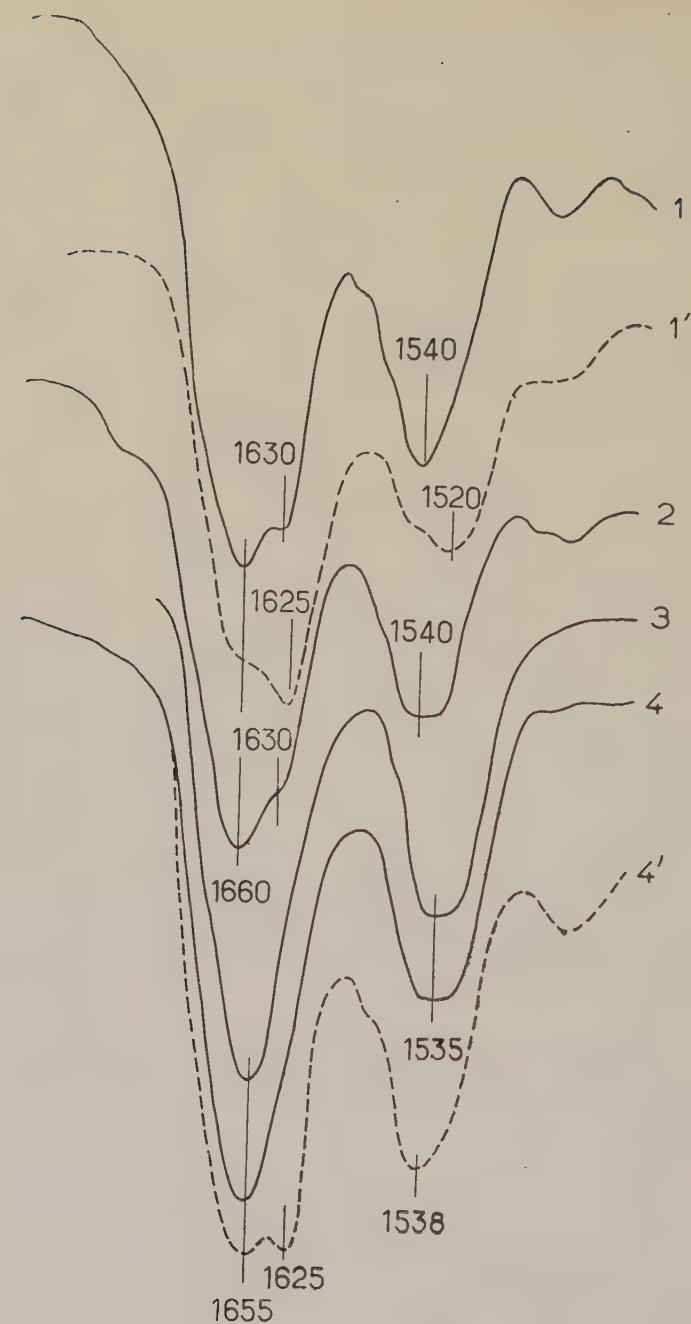


Fig. 6. — Histone. Films.

- 1 : Histone *a*. 1' : Histone *a* + xylène sulfonate de sodium 7,5 p. 100.
 2 : Histone *b*.
 3 : Histone *c*.
 4 : Histone *d*. 4' : Histone *d* + xylène sulfonate de sodium 7,5 p. 100.

sés, le plus favorable soit le troisième procédé décrit, bien qu'il nécessite un important changement de *pH*.

Dans les autres cas, la protéine subit probablement une altération accidentelle pendant l'extraction.

Une telle altération n'est pas surprenante dans le cas de l'histone α , en raison de la longue durée de l'extraction : en particulier, la dissociation de la nucléohistone nécessite un séjour de 3 semaines dans une solution de NaCl 3 M. D'une manière générale on constate que les protéines se conservent mal en solution et on pourrait s'expliquer qu'une altération survienne lors de la dissociation.

La proportion de forme β paraît effectivement moins grande dans l'histone b , préparée à l'aide d'une dissociation rapide de la nucléohistone par l'acétate de baryum. Cependant cette technique n'est pas non plus satisfaisante, puisque l'absorption à $1\,630\text{ cm}^{-1}$ subsiste.

Seul le procédé qui consiste à écarter simplement l'acide nucléique en le précipitant par l'acide chlorhydrique dilué permet d'obtenir une histone en forme α .

On pourrait donc penser que l'altération observée dans les autres cas est imputable à l'alcool employé pour précipiter l'acide nucléique, bien que son usage soit très général dans différentes méthodes d'extraction des protéines.

Quoi qu'il en soit, l'histone isolée par une méthode convenable paraît bien être en forme α .

§ II. — Effets de l'hydratation des films. Spectres en solution. —

A) EFFET DE L'HYDRATATION. — L'histone est très hygroscopique. Aussi nous a-t-il paru intéressant d'étudier son hydratation, afin de voir si elle correspond à un changement de structure.

Par rapport au spectre du film sec (fig. 7, courbe *a*), le spectre du film exposé à une atmosphère à 92 p. 100 d'humidité relative présente une modification de la bande à $1\,540\text{ cm}^{-1}$ (bande amide II) qui passe à $1\,550\text{ cm}^{-1}$. La bande $1\,650\text{ cm}^{-1}$ n'est pas modifiée (courbe *b*).

Il n'est pas possible d'interpréter actuellement le déplacement de la bande amide II de l'histone sous l'action de l'hydratation. Tout au plus indique-t-il vraisemblablement une interréaction eau-liaison peptidique.

B) SPECTRE EN SOLUTION. — L'histone c en solution dans D_2O présente (fig. 7, courbe *c*) :

- une bande forte à $1\,650\text{ cm}^{-1}$;
- une bande moyenne à $1\,460\text{ cm}^{-1}$.

Ce spectre est tout à fait caractéristique des protéines en solution dans l'eau lourde. La situation de la bande amide II à $1\,460\text{ cm}^{-1}$ est due à la deutération. Cette bande paraît plus intense, par rapport à la bande $1\,650\text{ cm}^{-1}$, que dans le film sec. En réalité elle est renforcée

par l'absorption des groupements DHO qui se produit à la même fréquence.



Fig. 7. — Histone c.

- a* : Film exposé à une atmosphère à moins de 10 p. 100 d'humidité relative.
b : Film exposé à une atmosphère à 100 p. 100 d'humidité relative.
c : Solution 10 p. 100 dans D₂O.

CHAPITRE II

Protamine.

Nous avons examiné deux types de protamines, l'une extraite du sperme de hareng, l'autre du sperme de truite (salmine). Dans les deux cas, les résultats sont identiques.

§ I. — **Résultats.** — A) ASPECT GÉNÉRAL DES SPECTRES (fig. 8, courbes *a* et *c*). — 1° *Film normal.* — Le spectre du film déshydraté de protamine (humidité < 10 p. 100) comporte (courbe *a*) : une bande forte et large vers $1\,655\text{ cm}^{-1}$ et une bande faible à $1\,545\text{ cm}^{-1}$ (cette bande a une intensité relative beaucoup plus faible que dans les spectres d'histone).

2° *Film deutéré.* — Le spectre d'un film déshydraté obtenu à partir d'une solution de protamine dans l'eau lourde est très différent. On peut observer deux sortes de transformations par rapport au spectre précédent (courbe *c*) : la disparition de la bande $1\,545\text{ cm}^{-1}$ remplacée par une bande intense à $1\,455\text{ cm}^{-1}$ et la dislocation du massif situé vers $1\,655\text{ cm}^{-1}$.

L'absorption dans cette région s'affaiblit et subsiste sous la forme de deux bandes séparées et peu intenses à $1\,660$ et $1\,645\text{ cm}^{-1}$, tandis qu'apparaissent deux sommets nouveaux à $1\,610$ à $1\,585\text{ cm}^{-1}$.

B) EFFET D'UNE DÉDEUTÉRATION PROGRESSIVE (fig. 9). — Nous avons examiné un film de protamine deutéré et exposé à une atmosphère dont l'humidité relative en H_2O ne dépassait pas 10 p. 100. Dans ces conditions, le film se dédeutère spontanément par échange avec l'atmosphère. Nous avons enregistré plusieurs spectres au cours de la dédeutération, en évaluant les proportions respectives d'hydrogène et de deutérium restant dans le film d'après les intensités relatives des bandes NH_2 et ND_2 dans les régions de $3\,250$ et $2\,500\text{ cm}^{-1}$.

Les bandes $1\,585$ et $1\,610\text{ cm}^{-1}$ ne s'observent que dans la courbe *a* (H 30 p. 100, D 70 p. 100), elles disparaissent dans la courbe *b* (H 60 p. 100, D 40 p. 100), tandis que l'absorption à $1\,660\text{ cm}^{-1}$ augmente.

Par contre, la bande $1\,455\text{ cm}^{-1}$ reste intense dans les courbes *a* et *b*, elle s'affaiblit un peu dans la courbe *c* (H 75 p. 100, D 25 p. 100), tandis qu'apparaît une faible absorption dans la région de $1\,555\text{ cm}^{-1}$. La courbe *d* (H 100 p. 100, D 0 o/o) comporte un sommet à $1\,555\text{ cm}^{-1}$ et l'absorption à $1\,455\text{ cm}^{-1}$ a presque totalement disparu.

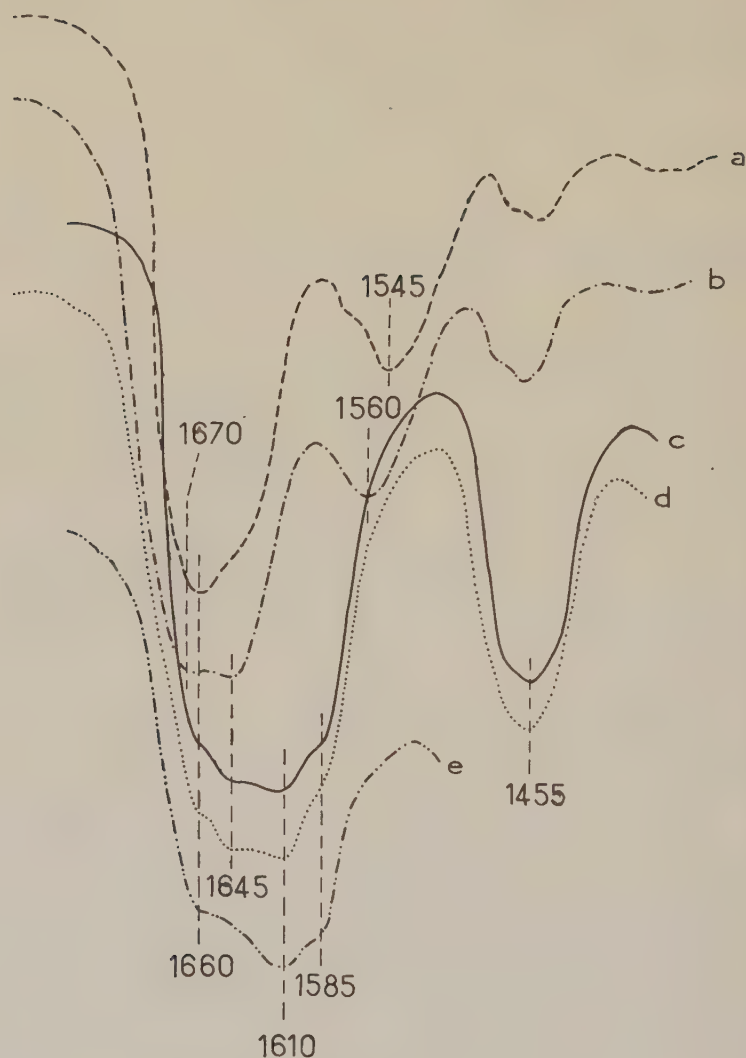


Fig. 8. — Sulfate de protamine.

- a* : Film exposé à une atmosphère à moins de 10 p. 100 d'humidité relative.
- b* : Film exposé à une atmosphère à 100 p. 100 d'humidité relative (vapeur H_2O).
- c* : Film deutéré exposé à une atmosphère à moins de 10 p. 100 d'humidité relative.
- d* : Film *c* exposé à une atmosphère à 100 p. 100 d'humidité relative (vapeur D_2O).
- e* : Solution de sulfate de protamine à 10 p. 100 dans D_2O .

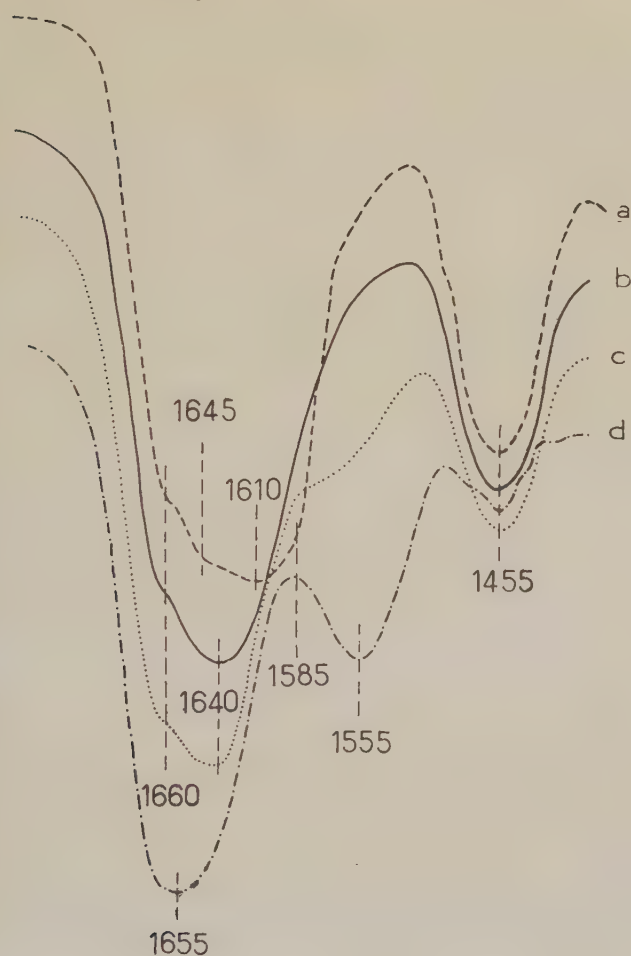


Fig. 9. — Sulfate de protamine. Dé deutération progressive d'un film.

	Deutérium	Hydrogène
	—	—
<i>a</i>	30 p. 100	70 p. 100
<i>b</i>	60 »	40 »
<i>c</i>	75 »	25 »
<i>d</i>	100 »	0 »

C) EFFET DE L'HYDRATATION (fig. 8, courbes *b* et *d*). — Si l'on examine un film non deutéré de protamine après un séjour de 12 heures dans une atmosphère de 100 p. 100 d'humidité relative, on observe

(courbe *b*) le dédoublement de la bande 1660 cm^{-1} en deux sommets à 1670 et 1645 cm^{-1} et le déplacement de la bande 1545 cm^{-1} qui passe à 1560 cm^{-1} .

L'hydratation du film deutéré par la vapeur d'eau lourde permet de noter une meilleure séparation des bandes 1610 et 1585 cm^{-1} . La bande de 1455 cm^{-1} ne varie pas (courbe *d*). Le spectre de la protamine en solution dans l'eau lourde est très semblable à celui du film hydraté (courbe *e*).

§ II. — **Discussion.** — A) SIGNIFICATION DES BANDES DANS CETTE RÉGION.

— La dislocation, sous l'effet de la deutération, du massif situé vers 1660 cm^{-1} montre que ce massif est en réalité composé de plusieurs bandes confondues : les unes représentent des vibrations non sensibles à la deutération qui subsistent à la même fréquence, les autres représentent des vibrations sensibles à la deutération et se déplacent vers les grandes longueurs d'onde.

On sait que la bande amide I de la liaison peptidique se situe à 1650 cm^{-1} (la bande est parfois dédoublee en deux sommets à 1660 et 1640 cm^{-1} ⁽¹⁰⁰⁾) et qu'elle n'est pas sensible à la deutération. Il paraît donc raisonnable d'attribuer à la liaison peptidique l'absorption observée à 1655 et 1645 cm^{-1} dans le spectre de la protamine.

Par contre les bandes 1610 et 1585 cm^{-1} des mêmes spectres ne peuvent être dues qu'à des groupements comportant des hydrogènes échangeables. On sait que la protamine est particulièrement riche en



arginine. Cet acide aminé est caractérisé par un groupement $-\text{C}=\text{NH}$ qui absorbe dans la région de 1650 cm^{-1} . On peut donc attribuer les



bandes 1610 et 1585 cm^{-1} au groupement $-\text{C}=\text{ND}$. Leur forte intensité par rapport à la bande 1660 cm^{-1} montre que l'absorption due à l'arginine est supérieure à celle de la liaison peptidique.



Par conséquent l'absorption du groupement $-\text{C}=\text{NH}$ en milieu non deutéré est responsable en majeure partie du massif observé à 1665 cm^{-1} . La liaison peptidique n'y contribue que pour une faible part.

Dans ces conditions, il est impossible de déterminer si la protamine est en structure α ou β .

La bande 1455 cm^{-1} qui passe à 1555 cm^{-1} par deutération est caractéristique de la liaison amide II des protéines, par sa position et son comportement. En milieu non deutéré, elle paraît plus faible, par

rapport à la bande 1660 cm^{-1} , que dans les spectres des autres protéines (et de l'histone en particulier). Mais il faut considérer que l'absorption à 1660 cm^{-1} est due principalement aux fonctions basiques de l'arginine, de telle sorte que la comparaison n'a pas de signification. Après deutération, la bande 1455 cm^{-1} , qui correspond à la bande 1545 cm^{-1} , paraît au contraire intense. Dans ce cas, la comparaison avec la bande située vers 1645 cm^{-1} est valable, puisque l'absorption due à l'arginine est déplacée à $1610\text{--}1585\text{ cm}^{-1}$ par deutération. L'intensité relative de la bande 1545 cm^{-1} se rapproche de celle qu'on observe en général dans les protéines, peut-être est-elle un peu plus forte. Il est possible que le film, même après un séjour en présence d'anhydride phosphorique, retienne une faible proportion d'humidité, et que l'absorption des groupements DHO renforce la bande considérée.

B) DÉTEUTÉRATION PROGRESSIVE. — Lorsqu'un film deutéré échange progressivement son deutérium contre de l'hydrogène, les bandes 1585

ND_2

|

et 1610 cm^{-1} des groupements —C=ND disparaissent en premier lieu, dès que la proportion en deutérium est inférieure à 70 p. 100.

Par contre, le déplacement de 1455 cm^{-1} à 1555 cm^{-1} , qui caractérise la dédeutération de la liaison peptidique, est à peine sensible pour une proportion de deutérium de 25 p. 100.

On peut en déduire que les groupements basiques de l'arginine sont nettement plus accessibles aux échanges que la liaison peptidique.

C) EFFET DE L'HYDRATATION. — Le dédoublement par hydratation de la bande 1655 cm^{-1} en deux sommets à 1660 et 1645 cm^{-1} dans le film non deutéré correspond à la séparation des bandes 1585 et 1610 cm^{-1} par exposition du film deutéré à la vapeur d'eau lourde. C'est un phénomène observé d'une manière très générale lorsque deux bandes ont des fréquences très voisines : elles ont tendance à se confondre à l'état sec parce que les sommets sont mal définis. L'hydratation rend les bandes plus étroites et améliore leur séparation. En milieu deutéré le phénomène est tout à fait semblable.

En milieu non deutéré, le déplacement par hydratation de la bande 1545 à 1560 cm^{-1} est semblable à celui observé pour la bande correspondante de l'histone (v. chap. précédent). Ce phénomène n'est pas explicable actuellement.

Résumé et conclusions.

Les données classiques sur l'histone indiquent seulement que c'est une protéine non coagulable par la chaleur, mais sans aucune précision sur sa structure.

Les caractéristiques spectrales, en particulier la fréquence élevée de la bande amide I, montrent que l'histone convenablement extraite n'est pas en forme β , c'est-à-dire n'appartient à aucune des variétés de « pleated sheet » décrites au chapitre premier. Sa grande solubilité confirme ce fait.

Du point de vue de la spectrographie infra-rouge on peut la classer dans le groupe des protéines α . Mais ce groupe comporte plusieurs structures possibles ⁽⁹⁹⁾ ⁽¹⁰⁰⁾ ⁽¹⁰⁸⁾ ⁽¹⁰⁹⁾. Nous ne sommes pas en mesure de déterminer par le dichroïsme de quelle structure il s'agit, car nous n'avons pas pu obtenir de films d'histone orientés.

On peut seulement dire que la fréquence de la bande amide I ne semble pas suffisamment élevée pour caractériser le « random coil » observé par Doty et Blout ⁽¹⁰⁸⁾. En outre, les peptides de ce type s'orientent facilement en passant en forme β lorsqu'on les étire pour préparer des films orientés ⁽¹⁰⁸⁾. Or, lorsque nous avons étiré l'histone dans ce but, nous n'avons observé ni orientation, ni variations de la bande $1\ 650\text{ cm}^{-1}$.

La basse viscosité, l'absence de biréfringence d'écoulement et d'orientabilité indiquent que l'histone séparée de l'acide nucléique est de forme générale globulaire.

Le spectre de la protamine est dominé par les bandes dues aux groupements basiques de l'arginine, qui masquent presque totalement l'absorption de la liaison peptidique. Par suite, il est impossible de déterminer la structure de cette protéine.

QUATRIÈME PARTIE

NUCLÉOPROTÉINES

On sait depuis longtemps que les acides nucléiques, en particulier le DNA, existent dans la cellule en combinaison avec des protéines. Suivant la nature de ces protéines on distingue les nucléoprotamines ⁽¹⁹⁾ ⁽¹¹⁰⁾, les nucléohistones ⁽²⁷⁾ ⁽²⁸⁾ ⁽³⁹⁾ ⁽¹¹¹⁾ et des nucléoprotéines plus complexes dont nous ne parlerons pas ici.

Grâce aux clichés de rayons X ⁽¹¹²⁾ ⁽¹¹³⁾, on a récemment suggéré

⁽¹¹⁰⁾ F. MIESCHER, *Med. Chem. Untersuchungen* (Hoppe-Seylers), 1871, **4**, 441.

⁽¹¹¹⁾ A. KOSSEL, *Z. Physiol. Chem.*, 1884, **8**, 511.

⁽¹¹²⁾ D. P. RILEY et U. W. ARNDT, *Nature*, 1953, **172**, 294.

⁽¹¹³⁾ M. H. F. WILKINS et B. BATTAGLIA, *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **11**, 412.

deux modèles analogues pour la nucléoprotamine et la nucléohistone. D'après ces modèles, la chaîne polypeptidique étendue s'enroule dans le petit espace compris entre les spires de l'acide nucléique (nucléoprotamine ⁽¹¹⁴⁾ ⁽¹¹⁵⁾), ou à la fois dans le petit et le grand espace qui séparent ces spires (nucléohistone ⁽¹¹⁶⁾).

Il existe très peu de données spectrographiques sur les nucléoprotéines. Les spectres de nucléoprotamine indiquent que la fraction nucléique a la même configuration que dans le DNA isolé ⁽⁶¹⁾. Ambrose et Butler ont cru pouvoir conclure à la forme β de la fraction protéique, suggestion critiquée par Fraser ⁽²⁵⁾ ⁽¹¹⁷⁾.

CHAPITRE PREMIER

Nucléohistone.

Nous avons étudié les spectres de nucléohistone extraite, à partir du thymus de veau, selon les deux méthodes principales indiquées au chapitre premier, § I-B (1^{re} partie). Nous les désignerons comme suit :

— « nucléohistone extraite par les sels », pour celle extraite par la méthode de Mirsky et Pollister ;

— « nucléohistone extraite par l'eau », pour celle extraite par la méthode de Crampton, Lipnitz et Chargaff.

§ I. — **Spectre de la nucléohistone à l'état de films. Effet de l'hydratation.** — A) RÉSULTATS. — La nucléohistone, à l'état de film, a le même spectre, quel que soit le mode d'extraction utilisé. Ce spectre présente un aspect différent selon le degré d'hydratation.

Un film exposé 12 heures à une atmosphère à 100 p. 100 d'humidité relative comporte (fig. 10, courbe *a*) une bande forte à $1\,650\text{ cm}^{-1}$, un épaulement bien marqué à $1\,708\text{ cm}^{-1}$ et une bande moyenne à $1\,540\text{ cm}^{-1}$.

Si on déshydrate progressivement le film, l'épaulement devient de moins en moins distinct et disparaît complètement si le film est exposé à une humidité relative inférieure à 10 p. 100. En outre, la bande $1\,540\text{ cm}^{-1}$ se déplace à $1\,530\text{ cm}^{-1}$ (fig. 10, courbe *c*).

⁽¹¹⁴⁾ M. FRUGHELMEN, R. LANGRIDGE, W. E. SEEDS, A. R. STOKES, H. R. WILSON, C. W. HOOPER, M. H. F. WILKINS, R. K. BARCLAY et L. O. HAMILTON, *Nature*, 1955, **175**, 834.

⁽¹¹⁵⁾ P. F. DAVIDSON, B. E. CONWAY et J. A. V. BUTLER, *Progr. in Biophys. and Biophys. Chem.*, 1954, **4**, 148 et 170.

⁽¹¹⁶⁾ M. H. F. WILKINS, 1957, sous presse.

⁽¹¹⁷⁾ R. D. B. FRASER, *Disc. of the Far. Soc. The Physical Chemistry of Proteins*, 1953, n° 13, 284.

Le phénomène est parfaitement réversible : si, après dessiccation totale on réhydrate le film, on voit réapparaître l'épaulement à

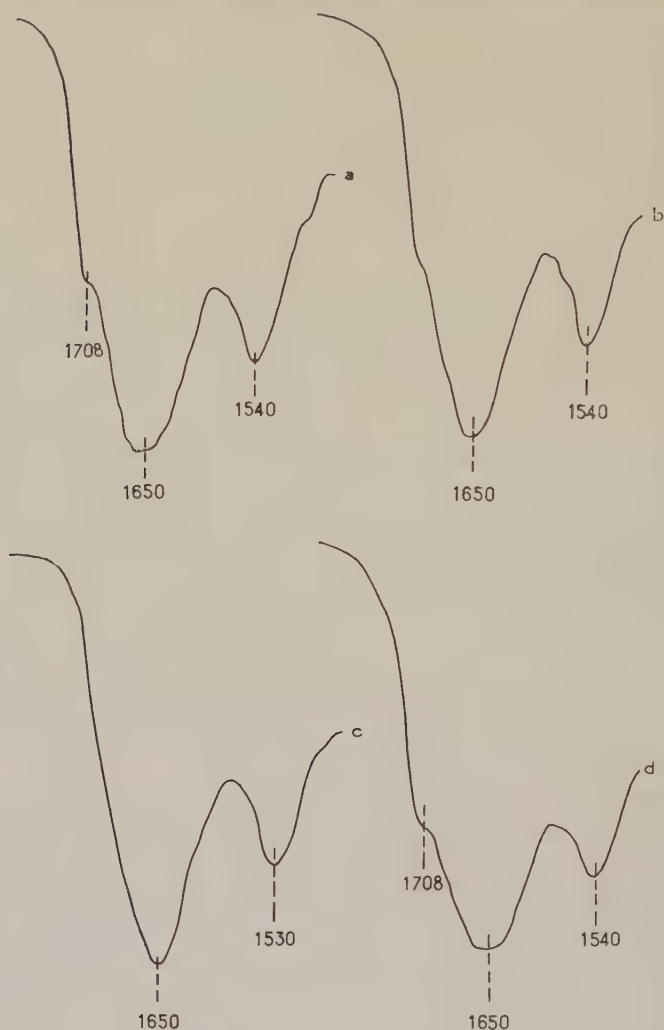


Fig. 10. — Nucléohistone extraite par les solutions de faible force ionique.
Effet de l'hydratation sur les films.

- a* : Film exposé à une atmosphère à 100 p. 100 d'humidité relative.
b : Film *a* exposé à une atmosphère à 60 p. 100 d'humidité relative.
c : Film *b* exposé à une atmosphère à moins de 10 p. 100 d'humidité relative.
d : Film *c* réhydraté dans une atmosphère à 100 p. 100 d'humidité relative.

1708 cm^{-1} , et la bande 1530 cm^{-1} reprend sa place à 1540 cm^{-1} (fig. 10, courbe d).

B) Discussion. — Les fortes bandes qui dominent le spectre de la nucléohistone à 1650 et 1540 cm^{-1} sont caractéristiques de la liaison peptidique dans les protéines en forme α (^{89 a 94}). Il semble donc raisonnable de les attribuer à l'histone. La variation de la bande 1540 cm^{-1} avec l'hydratation est tout à fait analogue à celle observée dans le cas de l'histone et confirme cette interprétation (III^e partie, chap. premier, § II-A. Nous avons vu qu'il n'est pas actuellement possible de préciser la signification de cette variation).

Toutefois l'acide nucléique présente également une bande à 1650 cm^{-1} et participe certainement à l'absorption de la nucléohistone. Cependant son coefficient d'absorption étant notablement plus faible que celui des protéines en général, il n'est pas douteux que la bande en question est principalement due à la fraction protéique de la molécule.

L'épaulement situé à 1708 cm^{-1} dans le film exposé à une humidité relative de 100 p. 100 n'a pas été observé dans le spectre des protéines. Il est situé à la même fréquence que la bande de l'acide nucléique caractérisant le haut polymère en forme B (II^e partie, § I). Rappelons que la déshydratation du DNA et son passage en forme A se traduit par le déplacement de cette bande à 1690 - 1695 cm^{-1} .

On peut également penser qu'il se produit le même phénomène lorsqu'on déshydrate la nucléohistone : lorsque la bande 1708 cm^{-1} se déplace vers les fréquences plus basses, elle est progressivement masquée par la forte absorption à 1650 cm^{-1} due à la protéine. Pour une hydratation moyenne, elle est encore visible sous la forme d'un épaulement vers 1700 cm^{-1} , et elle disparaît totalement à l'état sec.

Par conséquent, dans la nucléohistone, le DNA semble pouvoir passer réversiblement de la forme B à la forme A comme s'il était isolé.

Ces résultats sont en discordance avec ceux obtenus par Wilkins et Seeds (¹¹⁸). Ces auteurs estiment, en effet, que l'acide nucléique a toujours la structure B lorsqu'il est combiné à l'histone.

Il convient, comme nous l'avons fait pour l'acide nucléique (II^e partie, § I-B), de tenir compte des différences qui existent entre les techniques employées en spectrographie I. R. et dans l'examen aux rayons X.

La disparition de la bande d'absorption à 1708 cm^{-1} est obtenue après un plus long séjour sur P_2O_5 , donc pour une déshydratation plus forte que dans le cas du DNA. Il faut souligner que le phénomène reste réversible et que la réhydratation de l'échantillon fait réapparaître la bande.

(¹¹⁸) M. H. F. WILKINS et W. E. SEEDS, Communication personnelle.

Dans le cas de la diffraction aux rayons X, nous avons vu, à propos de l'acide nucléique, que les conditions d'existence de la structure A sont très critiques et qu'une dessiccation un peu forte, unie à l'étirement des fibres, amène rapidement une désorganisation des structures. Par suite, il est probable que, dans les expériences de Wilkins et Seeds, afin de maintenir la préparation dans de bonnes conditions, la nucléohistone n'a pas été suffisamment déshydratée pour que le passage de la forme B à la forme A se produise. Il est d'ailleurs probable que, dans les conditions de travail nécessaire à l'examen aux rayons X, une dessiccation plus poussée amènerait une désorganisation rapide des molécules.

§ II. — **Spectre de la nucléohistone en solution dans D_2O .** — A) RÉSULTATS. — Quel que soit le mode d'extraction, la nucléohistone à l'état de gel dans D_2O présente (fig. 11, courbes *b* et *d*) une bande forte à 1650 cm^{-1} parfois dédoublée en deux sommets à 1660 et 1640 cm^{-1} , un épaulement analogue à celui observé à l'état sec mais dont on situe cette fois le maximum à 1695 cm^{-1} et une double bande assez forte vers 1460 et 1445 cm^{-1} .

La nucléohistone extraite par les sels a également été examinée dans des solutions de NaCl 5 M et 1,5 M dans D_2O . Les courbes spectrales sont exactement semblables à celles du gel dans D_2O (fig. 11, courbes *a* et *c*).

B) DISCUSSION. — Le spectre de la nucléohistone en solution est dominé, comme dans le cas des films, par l'absorption due à la fraction protéique.

La bande amide I située à 1650 cm^{-1} peut être dédoublée en deux sommets. Ce phénomène a été observé par Lenormant et Blout⁽¹⁰⁰⁾ dans le cas de nombreuses protéines en solution dans D_2O . La signification de ce dédoublement n'a pas encore été précisée. Mais il est certain qu'il n'est pas en rapport avec une dénaturation même partielle.

La situation de la bande amide II vers 1450 cm^{-1} est due à la deutération. Comme dans le cas de l'histone, l'absorption des groupements DHO renforce cette bande.

L'épaulement observé à 1695 cm^{-1} correspond vraisemblablement à la bande 1680 cm^{-1} de l'acide nucléique hydraté deutéré (II^e partie, § II). La discordance de fréquence s'explique de deux manières :

— tout d'abord la bande est masquée par la forte absorption protéique à 1650 cm^{-1} . Elle n'est visible que sous forme d'un épaulement dont le maximum est difficile à pointer ;

— de plus, nous avons vu que l'acide nucléique deutéré en solution possède en réalité dans cette région une absorption assez large qui comporte deux sommets, l'un à 1680 cm^{-1} , l'autre vers 1695 cm^{-1} .

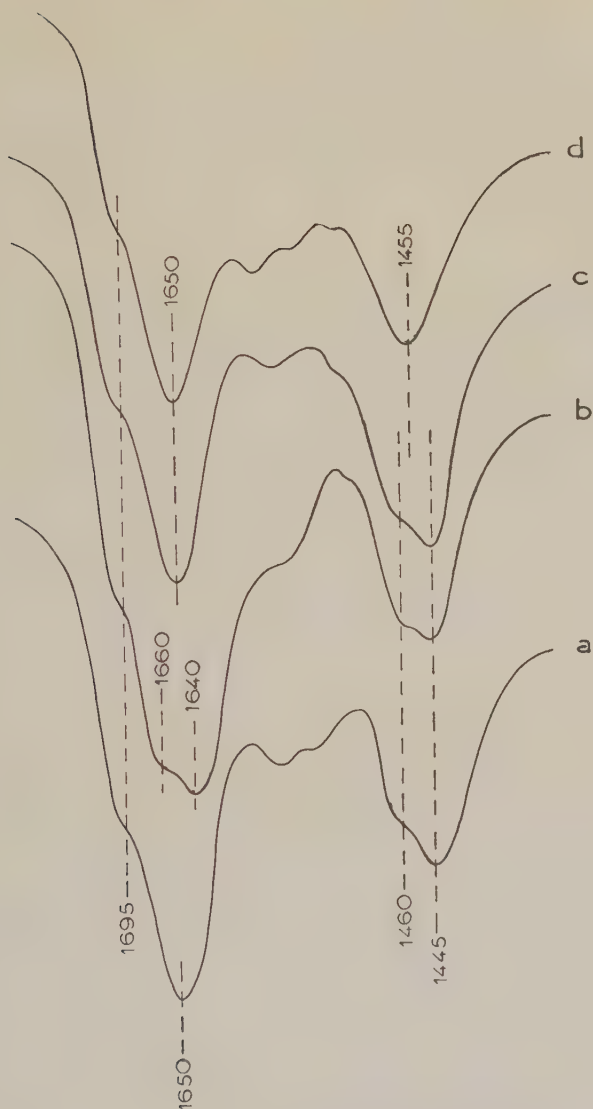


Fig. 11. — Nucléohistone.

- | | |
|---|-----------------------------------|
| <p>a : 10 p. 100 dans NaCl 0,15 M (dans D₂O)..
 b : 10 p. 100 dans D₂O
 c : 10 p. 100 dans NaCl 5 M (dans D₂O).....
 d : 10 p. 100 dans D₂O ; extraction par les solutions de faible force ionique.</p> | <p>} Extraction par les sels.</p> |
|---|-----------------------------------|

L'épaulement observé dans le spectre de la nucléohistone correspond à l'ensemble de cette absorption.

§ III. — **Action du xylène sulfonate de sodium sur la nucléohistone.** — Cette étude a été faite sur la nucléohistone à l'état de gel 10 p. 100 dans D_2O , dont le spectre, rappelons-le, comporte une bande forte à 1650 cm^{-1} (ou dédoublée à 1660 - 1640), un épaulement à 1692 - 1695 cm^{-1} et une bande assez forte à 1450 cm^{-1} (ou dédoublée 1460 - 1440).

A) RÉSULTATS. — L'action du xylène sulfonate se manifeste de la même manière, quel que soit le mode d'extraction de la nucléohistone.

Le gel présente un nouveau spectre (fig. 12, courbe *b*) dans lequel le phénomène le plus marqué est une diminution de l'absorption relative à 1650 cm^{-1} (le sommet se trouve cette fois à 1645 cm^{-1}) et l'apparition d'une bande nouvelle forte à 1625 cm^{-1} . Dans le spectre modifié l'épaulement précédemment décrit apparaît plus nettement, son maximum est légèrement déplacé à 1680 cm^{-1} .

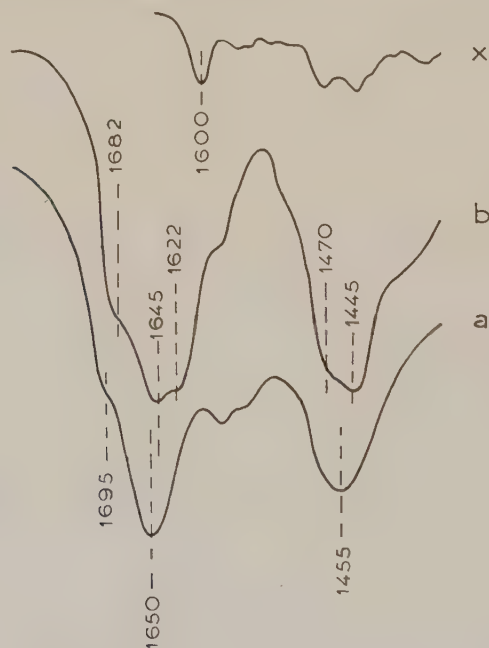


Fig. 12. — Nucléohistone extraite par les solutions de faible force ionique.
Effet du xylène sulfonate de sodium.

x : Xylène sulfonate de sodium 30 p. 100 dans D_2O .

a : Gel de nucléohistone 10 p. 100 dans D_2O .

b : Gel *a* + xylène sulfonate de sodium 7,5 p. 100 ou 30 p. 100.

La courbe *x* représente le spectre du xylène sulfonate 30 p. 100 dans D₂O, c'est-à-dire à la concentration maximum utilisée dans nos expériences (dans le cas de la nucléohistone, nous avons seulement fait agir une concentration de 7,5 p. 100). On voit que le détergent ne présente pas d'absorption importante dans la région étudiée; il existe seulement une très faible bande à 1 600 cm⁻¹. La bande 1 625 cm⁻¹ qui apparaît dans la courbe *b* ne peut donc être attribuée à l'absorption du xylène sulfonate. En outre, cette absorption serait compensée par la cuve de référence, qui contient une solution à 7,5 p. 100 de détergent.

B) Discussion. — On sait que l'apparition d'une bande à 1 625 cm⁻¹ caractérise la dénaturation des protéines et leur passage de la forme α à la forme β ⁽⁹¹⁾ ⁽¹⁰⁷⁾. Une telle transformation se produit donc dans la nucléohistone sous l'action du xylène sulfonate de sodium, dont nous avons décrit ailleurs les propriétés dénaturantes (V. 1^{re} partie, chap. II, § IV-A).

Cette transformation peut n'être pas totale et il est possible que le sommet qui subsiste à 1 645 cm⁻¹ soit dû en partie à un reste d'absorption protéique. Mais on peut admettre qu'il s'agit principalement de la bande 1 645 cm⁻¹ de l'acide nucléique, précédemment masquée par la bande de la protéine.

L'épaulement dû à la bande 1 680 cm⁻¹ du DNA devient beaucoup mieux visible en raison des différentes modifications spectrales. En outre, et pour la même raison, sa position apparente se rapproche de la position réelle de la bande.

§ IV. — **Action de la désoxyribonucléase sur la nucléohistone à l'état de gel dans D₂O.** — A) RÉSULTATS. — Rappelons que le spectre de la nucléohistone est le même quels que soient le mode d'extraction et le mode d'hydratation (eau lourde, solution NaCl 3 M ou de NaCl 0,15 M dans D₂O). Il comprend une bande très forte à 1 650 cm⁻¹ (ou 1 660-1 640 cm⁻¹), un épaulement à 1 695 cm⁻¹ et une bande forte à 1 450 cm⁻¹.

Contrairement à celle du xylène sulfonate, l'action de la DNase se manifeste de trois manières différentes. Dans une première série d'expériences ⁽¹¹⁹⁾ ⁽¹²⁰⁾ nous avons pu déterminer les résultats suivants :

1^{er} cas : la nucléohistone est extraite par les sels et dissoute dans l'eau lourde.

Après liquéfaction du gel par la désoxyribonucléase, la nouvelle courbe (fig. 13, courbe *b*) est caractérisée par un affaiblissement considérable de l'épaulement à 1 695 cm⁻¹ ou sa disparition dans les cas les plus favorables. Les autres bandes demeurent inchangées.

⁽¹¹⁹⁾ C. DE LOZÉ, *J. de Physiol.*, 1956, **48**, 506.

⁽¹²⁰⁾ C. DE LOZÉ et H. LENORMANT, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 450.

Après addition de xylène sulfonate de sodium à la préparation, on obtient un spectre (fig. 13, courbe *c*) dans lequel l'absence de cet épaulement se manifeste plus nettement à cause d'une diminution d'absorption à 1660 cm^{-1} . L'aspect du massif de bandes entre 1660 et 1625 cm^{-1} est d'ailleurs un peu différent de celui observé après action

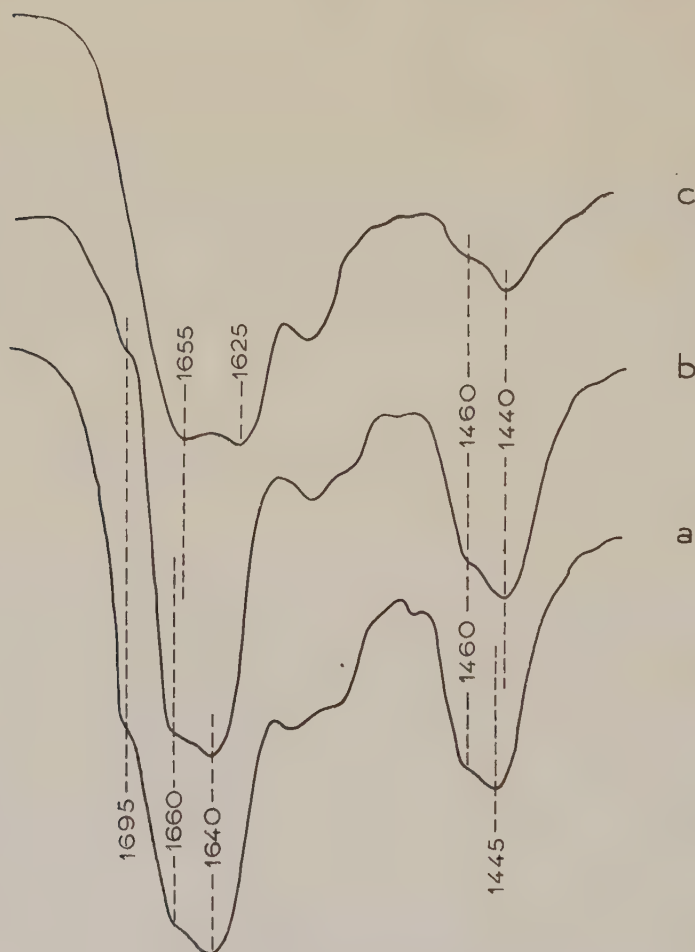


Fig. 13. — Nucléohistone extraite par les sels et dissoute dans D_2O .
Action de la désoxyribonucléase et du xylène sulfonate de sodium.

a : Gel de nucléohistone 10 p. 100 dans D_2O .

b : Préparation *a* + désoxyribonucléase.

c : Préparation *b* + xylène sulfonate de sodium 7,5 p. 100.

du xylène sulfonate sur la nucléohistone native : le sommet de fréquence la plus élevée est à 1655 cm^{-1} au lieu de 1645 cm^{-1} , il est en outre plus large et moins distinct (comparer avec fig. 12, courbe *b*).

2^e cas : la nucléohistone est extraite par les sels et dissoute dans une solution de NaCl 5 M dans D_2O .

La désoxyribonucléase ne liquéfie pas la solution visqueuse de nucléohistone et le spectre du produit ne change pas.

Si on fait agir le xylène sulfonate de sodium, on obtient exactement les mêmes bandes qu'en l'absence de désoxyribonucléase.

3^e cas : la nucléohistone est extraite par l'eau et dissoute dans D_2O .

La liquéfaction du gel par la désoxyribonucléase ne correspond le plus souvent qu'à un faible changement spectral : la bande 1695 cm^{-1} est seulement un peu atténuée (fig. 14, courbe *b*).

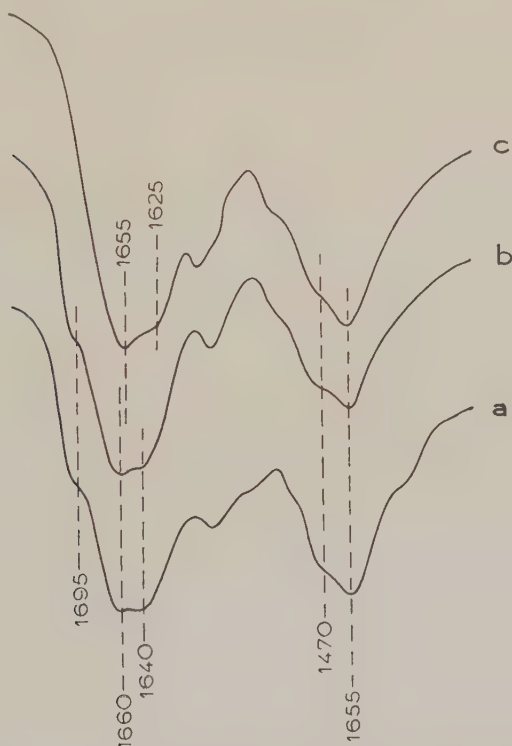


Fig. 14. — Nucléohistone extraite par les solutions de faible force ionique.
Effet de la désoxyribonucléase et du xylène sulfonate de sodium.

a : Gel de nucléohistone 10 p. 100 dans D_2O .

b : Préparation *a* + désoxyribonucléase.

c : Préparation *b* + xylène sulfonate de sodium 7,5 p. 100.

On n'observe de modification importante que si on fait agir ultérieurement le xylène sulfonate. Le spectre est alors caractérisé par la disparition de la bande à $1\,695\text{ cm}^{-1}$ et par la présence d'un massif à deux sommets, l'un bien distinct à $1\,622\text{ cm}^{-1}$, l'autre plus large à $1\,655\text{ cm}^{-1}$ (fig. 14, courbe c).

Ce spectre est identique à celui de la nucléohistone extraite par les sels et traitée de la même manière (comparer avec fig. 13, courbe c).

A la suite de ces premiers résultats, des expériences plus nombreuses nous ont amenés à faire les remarques suivantes :

1° En ce qui concerne l'action de la désoxyribonucléase, la différence n'est pas aussi marquée que nous le pensions entre le comportement de la nucléohistone extraite par les sels et celui de la nucléohistone extraite par l'eau (1^{er} cas et 2^e cas). En effet, dans le cas de la nucléohistone extraite par les sels, on n'observe que rarement la disparition totale de l'épaulement à $1\,695\text{ cm}^{-1}$. Dans beaucoup de cas il ne fait que s'atténuer et nous avons même observé au cours de deux expériences que son intensité ne se modifiait pas, bien qu'une liquéfaction complète du gel ait eu lieu.

2° En ce qui concerne l'effet du xylène sulfonate après action de la DNase, les résultats, pour la nucléohistone extraite par l'eau, sont constamment conformes à ce que nous avons décrit précédemment.

Mais dans le cas où la nucléohistone est extraite par les sels, lorsque l'épaulement à $1\,695\text{ cm}^{-1}$ subsiste après action de la désoxyribonucléase, son aspect se modifie peu ou demeure inchangé lorsqu'on ajoute du xylène sulfonate.

B) DISCUSSION. — 1° *Action de la DNase.* — Nous avons vu à propos de l'acide nucléique en solution dans D_2O que le haut polymère se distingue nettement du bas polymère par la présence d'une bande à $1\,680\text{ cm}^{-1}$ portant un épaulement à $1\,695\text{ cm}^{-1}$ (II^e partie, § II). Nous avons également vu que cette bande est assez bien visible dans le spectre du gel de nucléohistone sous forme d'un épaulement vers $1\,695$ - $1\,692\text{ cm}^{-1}$. La disparition de ce dernier après l'action de la DNase, lorsqu'elle se produit, peut être attribuée à la dépolymérisation de la fraction nucléique de la molécule. Mais il n'en est pas toujours ainsi.

Tout d'abord, lorsque la DNase agit en présence de $\text{NaCl } 5\text{ M}$, l'absence de modifications spectrales s'explique par l'inhibition de l'enzyme ⁽³⁷⁾ ⁽³⁸⁾. La préparation se comporte alors comme en l'absence de DNase. Le gel initial ne subit d'ailleurs aucune modification apparente.

Dans les autres cas, il apparaît que les phénomènes sont beaucoup plus complexes. D'après nos premières expériences, nous avons établi une distinction entre la nucléohistone extraite par les sels et la nucléohistone extraite par l'eau. Dans le cas de la première, en effet, l'action enzymatique est obtenue en 1 heure à 11° C et la bande $1\,695\text{ cm}^{-1}$

disparaît. Pour la nucléohistone extraite par l'eau, le gel ne se liquéfie qu'après 24 heures à 11° C (ou 1 heure à 28° C) et la bande subsiste.

Nous avons expliqué ces phénomènes en rappelant que les solutions salines concentrées ont pour effet de dissocier l'acide nucléique de la protéine (V. I^{re} partie, chap. premier, § I-B). La recombinaison qui a lieu dans la suite de la préparation ne respecte probablement pas l'état natif de la nucléohistone, en ce sens que les deux fractions de la molécule ne sont plus appariées comme à l'origine et peut-être moins étroitement unies. L'acide nucléique est donc plus facilement attaqué par l'eau où la dissociation des deux fractions ne s'étant pas produite, l'architecture générale de la molécule est mieux respectée et où la protéine exerce une sorte d'effet protecteur.

En fait, il semble, d'après ce que nous avons dit plus haut (A), qu'il n'y ait guère de différence entre les deux échantillons. L'effet protecteur de la protéine semble être le même, qu'elle reste dans son arrangement original ou qu'elle ait été dissociée puis recombinaison. Tout au plus peut-on dire que cet effet est un peu plus marqué dans le cas de la nucléohistone extraite par l'eau.

2° *Action du xylène sulfonate après action de la DNase.* —

a) Selon nos premières expériences, l'action du xylène sulfonate sur la nucléohistone extraite par les sels, après dépolymérisation de la fraction nucléique, affaiblit l'absorption à $1\,650\text{ cm}^{-1}$ due à la protéine et confirme que les bandes relatives à l'acide nucléique ne sont plus celles du haut polymère. En effet, la disparition de l'épaulement à $1\,695\text{ cm}^{-1}$ devient encore plus évidente. La large bande dont le maximum se situe vers $1\,655\text{ cm}^{-1}$ représente vraisemblablement l'absorption à $1\,660\text{ cm}^{-1}$ du bas polymère, associée à un reste d'absorption à $1\,650\text{ cm}^{-1}$ de la protéine non dénaturée.

En fait, la suite de nos expériences a montré que, dans les cas où l'épaulement à $1\,695\text{ cm}^{-1}$ n'est pas modifié par l'action de la DNase, il subsiste également après dénaturation de la protéine. On peut en conclure que l'acide nucléique n'a pas été attaqué par l'enzyme, sans doute à cause de l'effet protecteur de la protéine.

b) Dans le cas de la nucléohistone extraite par l'eau, nous avons obtenu d'une manière constante les mêmes résultats : la bande $1\,695\text{ cm}^{-1}$, qui subsiste après action de la DNase, disparaît lorsque le xylène sulfonate a dénaturé la fraction protéique. Le spectre présente une forte absorption vers $1\,655\text{ cm}^{-1}$ qui représente sans doute la bande $1\,660\text{ cm}^{-1}$ du bas polymère associé à un reste d'absorption de la protéine non dénaturée. L'acide nucléique a donc dû être dépolymérisé avant l'addition du détergent, qui ne peut avoir aucun effet sur lui. Si l'on admet que l'extraction par l'eau ne perturbe pas l'architecture originale de la molécule, on peut supposer que, malgré la coupure d'un certain nombre de liaisons phosphatées par l'enzyme, les frag-

ments restent maintenus par la protéine intacte dans une configuration analogue à celle du haut polymère. Ainsi s'expliquerait la persistance de la bande 1695 cm^{-1} caractéristique de cette structure. Le xylène sulfonate, en désorganisant la protéine, supprimerait la contrainte qu'elle faisait subir à l'acide nucléique. Celui-ci pourrait alors perdre la structure initiale B et prendre la configuration habituelle du bas polymère.

§ V. — *Action de la désoxyribonucléase sur la nucléohistone à l'état de film.* — A) RÉSULTATS. — Nous avons également étudié l'action de la désoxyribonucléase sur des films de nucléohistone exposés 24 heures à une humidité relative de 90 p. 100.

Nous avons vu que dans ces conditions l'absorption due à l'acide nucléique se traduit par une bande à 1705 cm^{-1} bien distincte de la bande 1650 cm^{-1} relative à la protéine. La bande 1705 cm^{-1} correspond à l'épaulement 1695 cm^{-1} des échantillons hydratés sur lequel portent, comme nous venons de le voir, les modifications spectrales dues à l'action de la DNase. Nous avons pensé que ces modifications seraient encore mieux visibles sur le film, en raison de la position plus favorable de la bande.

Nous avons procédé de deux manières différentes :

1° On prépare deux films, l'un à partir d'un gel de nucléohistone native, l'autre à partir d'un gel liquéfié par des traces d'enzyme en poudre. On compare les deux spectres : on observe dans le second, contrairement à ce qui se passe pour le gel, la disparition de la bande du haut polymère (1708 cm^{-1}).

En raison de cette anomalie, nous avons essayé un deuxième procédé.

2° On prépare un film à partir de la nucléohistone native et on enregistre son spectre. On passe sur le film un papier-filtre imbibé d'une solution au $1/4000$ de DNase. Si l'on enregistre des spectres à intervalles réguliers, on constate une disparition progressive assez lente de la bande 1708 cm^{-1} (fig. 15).

B) DISCUSSION. — Quelle que soit son origine la nucléohistone à l'état de film se comporte de la même manière : la bande 1708 cm^{-1} (qui correspond à la bande 1695 cm^{-1} du gel) disparaît, indiquant que l'acide nucléique a été dépolymérisé.

L'effet protecteur de la protéine, observé lorsque la préparation est examinée à l'état de gel, ne se produit donc pas. A la suite de nos premières expériences, où nous avons hydrolysé le gel avant de préparer le film, nous avons pensé que la dessiccation sur une lame exerçait des tractions sur la molécule déjà attaquée par l'enzyme et achevait de la désorganiser. C'est pourquoi nous avons employé le deuxième procédé qui consiste à maintenir le film à 95 p. 100 d'hydratation, et à faire agir la désoxyribonucléase sur le film lui-même. Comme nous l'avons

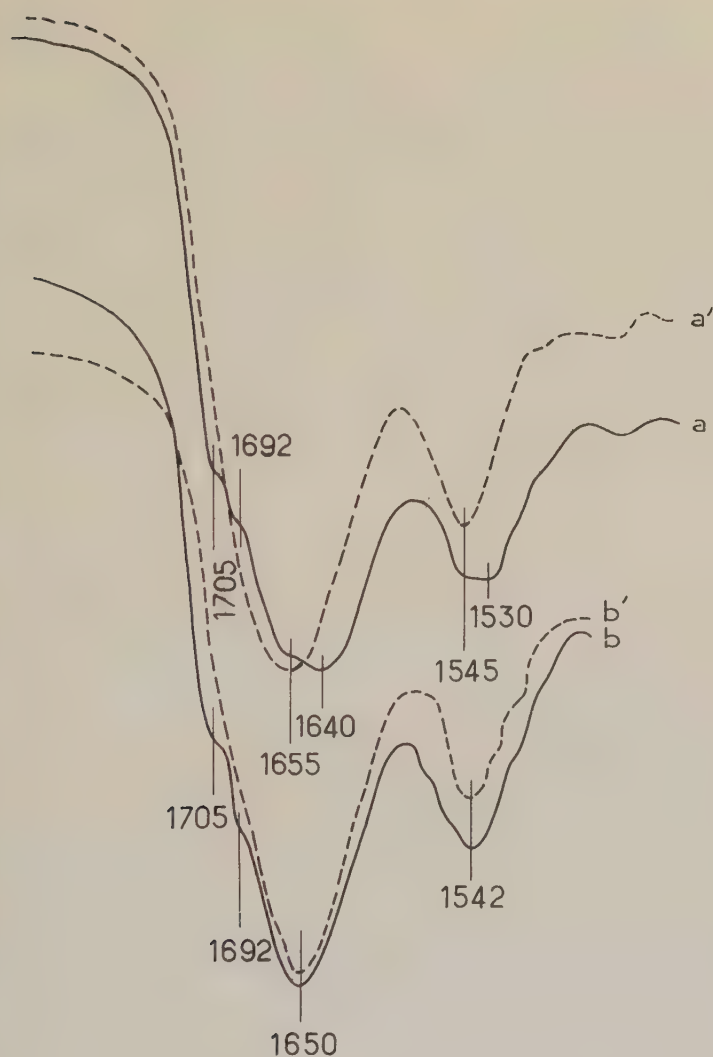


Fig. 15. — Nucléohistone. Effet de la désoxyribonucléase sur les films exposés à une atmosphère à 95 p. 100 d'humidité relative.

Courbes en traits pleins *a* et *b* :

a : Films de nucléohistone extraite par les sels.

b : Films de nucléohistone extraite par les solutions de faible force ionique.

Courbes en pointillé *a'* et *b'* :

Films *a* et *b* après action de la désoxyribonucléase.

vu, le résultat est semblable : la bande caractéristique du haut polymère disparaît.

Il semble donc bien qu'à l'état de film, la nucléohistone n'a pas le même comportement qu'à l'état de gel. Cette différence peut avoir deux causes : tout d'abord, il faut considérer que dans un film, même hydraté à 95 p. 100, les molécules subissent certaines contraintes qui n'existent pas dans un gel, où la proportion d'eau est beaucoup plus grande (100 mg de substance pour 1 cm³ d'eau) et où les conditions sont beaucoup plus proches des conditions naturelles. Par ailleurs, l'examen des préparations montre que l'attaque du film par l'enzyme est très inégale : en certains points de la lame se produisent des précipités, tandis que d'autres portions du film semblent ne pas avoir été hydrolysées. Lorsqu'on opère en solution, au contraire, le gel se liquéfie de manière homogène et sans précipiter. Pratiquement, il apparaît, d'après ces expériences, que l'effet protecteur de l'histone contre l'action enzymatique ne se produit pas à l'état sec, et que le DNA se dépolymérise comme s'il était isolé.

§ VI. — *Spectres en lumière polarisée* (fig. 16). — Un film de nucléohistone exposé à une atmosphère à 93 p. 100 d'humidité relative (courbe *a*) présente un fort dichroïsme perpendiculaire de la bande située à 1 705 cm⁻¹. Il n'y a en général pas de dichroïsme pour les autres bandes sinon parfois, dans les films très bien orientés, un dichroïsme perpendiculaire faible de la bande située à 1 660 cm⁻¹.

Quand on déshydrate le film, la bande 1 705 cm⁻¹ s'affaiblit et son dichroïsme s'atténue (courbe *b*).

Nous avons vu qu'en milieu hydraté la bande 1 705 cm⁻¹ est due à l'acide nucléique en forme B (II^e partie, § II-B). Le dichroïsme de cette bande est également conforme à celui observé pour le DNA (II^e partie, § III). Comme nous l'avons dit, il semble que la déshydratation ait pour effet de faire passer l'acide nucléique en forme A, dont la bande 1 690 cm⁻¹ est masquée par l'absorption protéique à 1 660 cm⁻¹. On ne peut donc observer le dichroïsme de cette bande ; ce dichroïsme est d'ailleurs nul dans l'acide nucléique isolé.

Si l'on observe parfois un léger dichroïsme perpendiculaire pour la bande 1 660 cm⁻¹, on n'en observe jamais pour la bande 1 550 cm⁻¹. Nous avons rappelé à propos des protéines que le dichroïsme affecte les deux bandes de la liaison peptidique. Celui qu'on observe à 1 660 cm⁻¹ dans le spectre de la nucléohistone n'est donc probablement pas dû à l'histone mais à l'acide nucléique qui, comme nous l'avons vu, contribue à l'absorption à cette fréquence. Il est en effet conforme à celui obtenu pour la bande 1 660 cm⁻¹ du DNA.

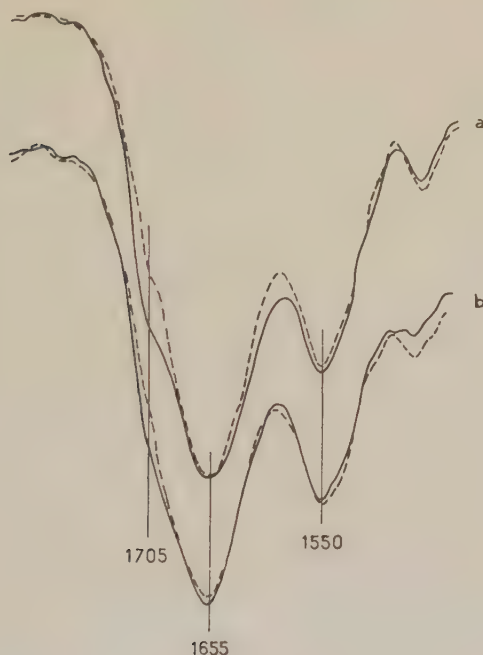


Fig. 10. — Nucléohistone. Films orientés. Spectres en lumière polarisée.

Courbes *a* : Films exposés à une atmosphère à 95 p. 100 d'humidité relative.
 Courbes *b* : Films exposés à une atmosphère à moins de 10 p. 100 d'humidité relative.

Courbes en traits pleins : Vecteur perpendiculaire à la direction d'étirement.
 Courbes en pointillé : Vecteur parallèle à la direction d'étirement.

CHAPITRE II

Nucléoprotamine.

§ I. — *Caractères des spectres.* — A) RÉSULTATS. — Le spectre de la nucléoprotamine à l'état de film comporte (fig. 17, courbe *a*) : une bande forte et large dont le sommet est situé vers 1660 cm^{-1} , une bande faible à 1550 cm^{-1} et parfois un faible épaulement à 1700 cm^{-1} .

L'hydratation de ce film par la vapeur d'eau ordinaire a pour effet de dédoubler la bande 1660 cm^{-1} en deux sommets à 1670 et 1645 cm^{-1}

et de déplacer la bande 1550 cm^{-1} à 1560 cm^{-1} (fig. 17, courbe *b*). En outre, on observe un épaulement marqué à 1710 cm^{-1} .

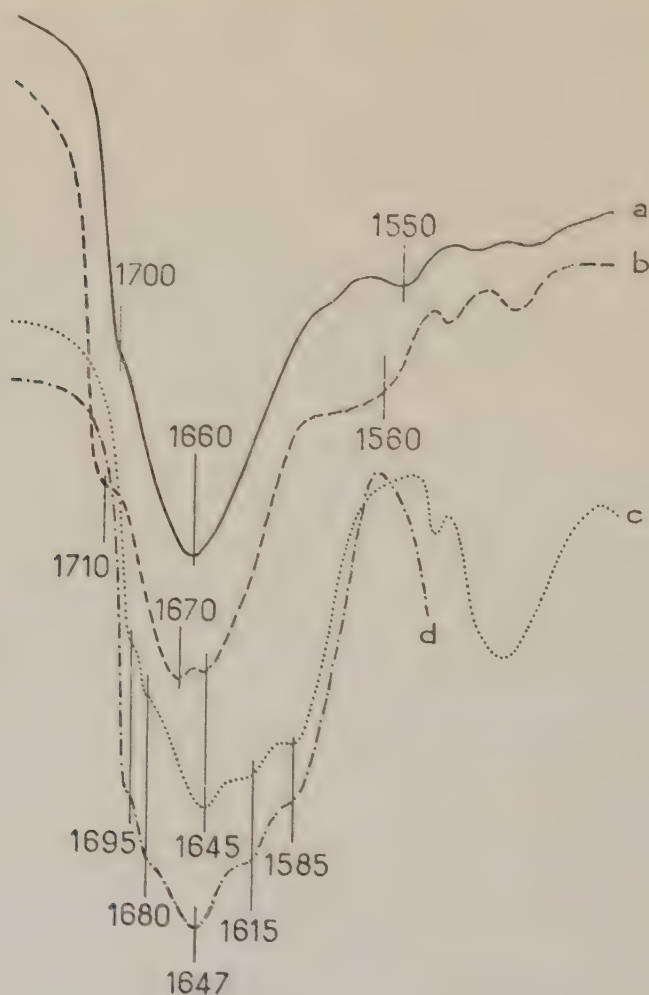


Fig. 17. — Nucléoprotamine.

- a* : Film exposé à une atmosphère à moins de 10 p. 100 d'humidité relative.
b : Film exposé à une atmosphère à 100 p. 100 d'humidité relative (vapeur H_2O).
c : Film deutéré exposé à une atmosphère à 100 p. 100 d'humidité relative (vapeur D_2O).
d : Gel de nucléoprotamine 10 p. 100 dans D_2O .

La deutération et l'hydratation du film par la vapeur d'eau lourde font apparaître des modifications spectrales importantes (fig. 17, courbe c) :

— le massif situé vers $1\,660\text{ cm}^{-1}$ se disloque. L'absorption relative dans cette région diminue; il subsiste une bande à $1\,645\text{ cm}^{-1}$, tandis que deux nouvelles bandes apparaissent à $1\,615$ et $1\,585\text{ cm}^{-1}$;

— on observe deux épaulements peu distincts à $1\,680$ et $1\,695\text{ cm}^{-1}$ au lieu d'un épaulement marqué à $1\,710\text{ cm}^{-1}$;

— l'absorption vers $1\,560\text{ cm}^{-1}$ disparaît, tandis qu'une bande nouvelle apparaît à $1\,450\text{ cm}^{-1}$.

Le spectre de la nucléoprotamine en solution dans D_2O est semblable à celui du film hydraté deutéré (fig. 17; courbe d).

B) DISCUSSION. — 1° *Bandes situées entre $1\,660$ et $1\,540\text{ cm}^{-1}$.* — Si l'on compare l'absorption dans cette région avec celle de la protamine examinée dans les mêmes conditions (v. III^e partie, chap. II), on constate que, dans les deux séries de spectres, les bandes occupent les mêmes positions et subissent les mêmes variations avec l'hydratation ou la deutération.

On peut donc attribuer cette absorption à la fraction protéique de la molécule de nucléoprotamine.

La bande $1\,550$ (produit sec) ou $1\,560\text{ cm}^{-1}$ (produit hydraté) du film ordinaire, qui passe à $1\,450\text{ cm}^{-1}$ par deutération, représente la bande amide II de la liaison peptidique. Nous avons étudié, à propos de la protamine et de l'histone, son comportement vis-à-vis de l'hydratation.

Comme nous l'avons établi en étudiant la protamine, les autres bandes sont dues principalement aux groupements basiques de l'arginine et masquent totalement la bande amide I de la liaison peptidique. On ne peut donc tirer aucune conclusion relative à la structure α ou β de la fraction protéique de la molécule d'après la position des sommets dans cette région.

Ambrose et Butler (²⁶), étudiant la nucléoprotamine de hareng, avaient cru pouvoir conclure à la structure β de la fraction protéique par suite de la présence d'un maximum à $1\,640\text{ cm}^{-1}$. Cette suggestion, qui avait d'ailleurs été critiquée par Fraser (¹¹⁷), ne peut être retenue en raison de ce que nous venons d'exposer.

On peut remarquer que, dans les spectres de nucléoprotamine en milieu deutéré, la bande la plus forte se trouve à $1\,645\text{ cm}^{-1}$ et non à $1\,610\text{ cm}^{-1}$ comme dans la protamine. L'acide nucléique présente, nous l'avons vu, une bande à $1\,649\text{ cm}^{-1}$ qui renforce probablement l'absorption de l'arginine à cette fréquence.

2° *Bandes situées entre $1\,680$ et $1\,710\text{ cm}^{-1}$.* — Ces bandes n'appartiennent pas au spectre de la protamine, et, de même que dans le cas de nucléohistone, elles doivent être attribuées à l'acide nucléique.

La bande située à $1\,710\text{ cm}^{-1}$ dans le film non deutéré hydraté est sans doute due à l'acide nucléique en structure B d'après ce que nous avons vu (II^e partie).

Comme dans le cas de nucléohistone, la dessiccation du film s'accompagne d'un changement de structure de l'acide nucléique qui tend à passer en structure A, puisque la bande se déplace vers les fréquences plus basses. Toutefois, le faible épaulement qui subsiste généralement à $1\,700\text{ cm}^{-1}$ indique que la transformation n'est pas totale. Si la bande passait en effet à la fréquence $1\,690\text{ cm}^{-1}$ caractéristique de la forme A elle serait totalement masquée par l'absorption vers $1\,660\text{ cm}^{-1}$.

On pourrait donner de ces phénomènes une interprétation en accord avec celle de Wilkins et Seeds (¹¹⁸), selon laquelle l'acide nucléique combiné à l'histone ne pourrait avoir la forme A. La nucléoprotamine ayant été extraite par une solution saline concentrée, une partie de l'acide nucléique peut avoir été séparée de la protamine et mal recombiningée dans la suite de la préparation. Il garde par suite une certaine liberté de transformation, tandis que le DNA combiné reste en forme B.

Toutefois, la nucléoprotamine étant très hygroscopique, on peut aussi penser que le film, même exposé à une humidité relative inférieure à 10 p. 100, conserve une petite quantité d'eau qui suffit à empêcher le passage total de l'acide nucléique en structure A.

En milieu deutéré, les deux épaulements situés à $1\,695$ et $1\,680\text{ cm}^{-1}$ correspondent à ceux observés par l'acide nucléique dans les mêmes conditions (V. II^e partie, § II).

§ II. — *Action du xylène sulfonate de sodium et de la désoxyribonucléase.* — A) RÉSULTATS. — 1° Si on ajoute 10 p. 100 de xylène sulfonate de sodium à un gel de nucléoprotamine dans D_2O , on observe peu de changement dans le spectre (fig. 18, courbes *a* et *b*). L'épaulement à $1\,680\text{ cm}^{-1}$ paraît légèrement déplacé à $1\,670\text{ cm}^{-1}$, la bande $1\,615\text{ cm}^{-1}$ augmente, et son sommet passe à $1\,610\text{ cm}^{-1}$. L'absorption relative à $1\,645\text{ cm}^{-1}$ diminue légèrement.

2° Si l'on fait agir la désoxyribonucléase pendant 1 heure à 11°C (comme dans le cas de la nucléohistone extraite par les sels) on n'obtient aucun changement spectral et le gel par ailleurs ne se liquéfie pas. Si on laisse l'enzyme au contact de la préparation pendant 24 heures à 11°C ou 1 heure à 28°C (conditions expérimentales pour la nucléohistone extraite par l'eau), on n'obtient pas non plus de résultats. Mais si l'action de la DNase se prolonge pendant 4 heures à 28°C , le gel est hydrolysé. Il se sépare alors en deux phases, un précipité compact et un liquide trouble.

Le spectre du liquide présente deux bandes fortes à $1\,660$ et à $1\,625\text{ cm}^{-1}$ et une bande assez forte à $1\,575\text{ cm}^{-1}$ (fig. 18, courbe *c*).

Il est très difficile d'obtenir un spectre lisible du précipité, en raison

de sa consistance élastique qui se prête mal à l'écrasement entre deux lames. Dans les cas les plus favorables, on observe un massif large, avec trois sommets mal distincts vers 1695 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} et une bande à 1580 cm^{-1} .

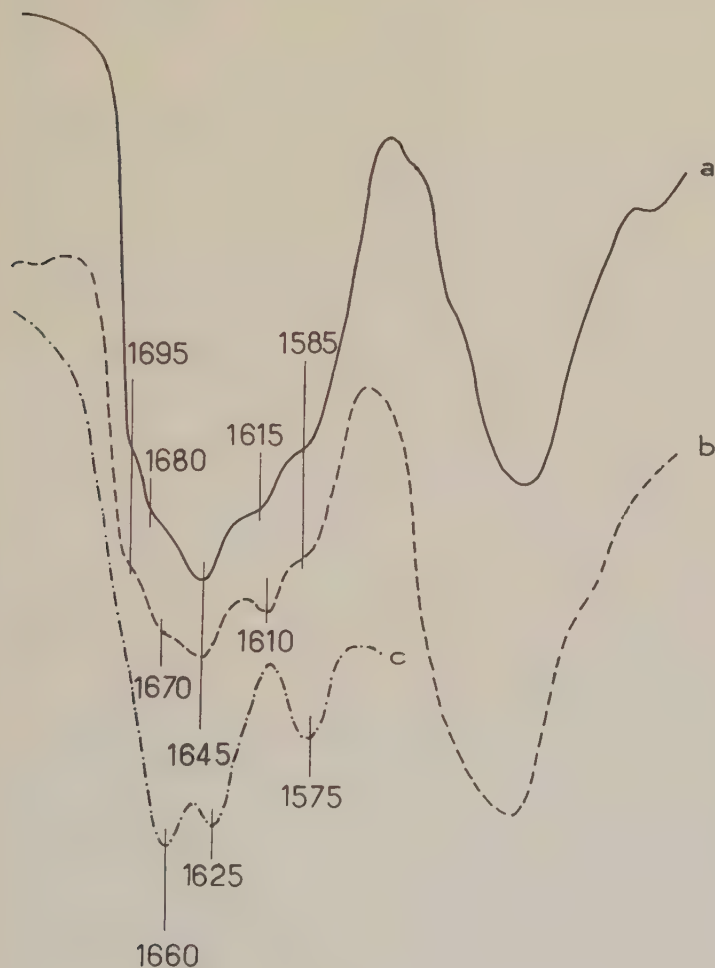


Fig. 18. — Nucléoprotamine 10 p. 100 dans D_2O .
Action du xylène sulfonate de sodium.

a : Gel de nucléoprotamine 10 p. 100 dans D_2O .

b : Gel *a* + xylène sulfonate de sodium 15 p. 100.

c : Gel *a* + désoxyribonucléase. Spectre de la fraction liquide.

B) Discussion. — 1° Comme nous l'avons vu à propos de la nucléohistone, la dénaturation d'une protéine α par le xylène sulfonate a pour effet de la faire passer en β et par suite de déplacer la bande amide I de la liaison peptidique de 1 650 à 1 625 cm^{-1} . Dans la nucléoprotamine, la bande amide I est probablement masquée par l'absorption de l'arginine et on ignore si son emplacement correspond à une forme α ou β . On pourrait donc s'attendre à n'observer aucun changement dans le spectre après addition de détergent à la préparation.

Les faibles modifications qui se produisent en fait sont difficiles à interpréter de manière certaine. Toutefois il n'est pas impossible qu'elles soient dues à des perturbations de la liaison peptidique dont les bandes participent certainement à l'absorption dans cette région. En effet, la diminution de l'absorption à 1 645 cm^{-1} et l'augmentation de l'absorption à 1 610 cm^{-1} pourraient suggérer un déplacement 1 650-1 625 cm^{-1} de la bande amide I au sein du massif. Cette hypothèse laisserait entendre, qu'à l'état natif, la fraction protéique de la nucléoprotamine est en forme α , comme celle de la nucléohistone. Mais il n'est pas possible de l'affirmer avec certitude.

2° En ce qui concerne l'action de la DNase, on peut remarquer en premier lieu qu'elle est beaucoup plus difficile à obtenir que dans le cas de la nucléohistone. Nous avons observé, à propos de cette dernière, que l'extraction par les sels facilite l'action de l'enzyme, probablement parce qu'il se produit durant la préparation une dissociation entre l'acide nucléique et la protéine. Dans la recombinaison qui a lieu par la suite, la protéine est moins solidement unie au DNA, qui se dépolymérise facilement, comme s'il était isolé. La nucléohistone extraite par l'eau est plus difficile à hydrolyser parce qu'elle conserve mieux sa configuration moléculaire et que la protéine, intimement unie au DNA, gêne l'action enzymatique.

Bien que la nucléoprotamine soit extraite par les sels, l'effet de la DNase est encore plus difficile à obtenir que dans le cas de la nucléohistone extraite par l'eau. On peut donc penser que, malgré la technique de préparation, la protéine forme une protection assez efficace contre l'enzyme. Rappelons que la protamine est beaucoup plus riche en fonctions basiques (et en fonctions basiques fortes) que l'histone. L'effet protecteur semble en rapport avec l'importance des fonctions basiques. On peut expliquer ce phénomène en admettant que dans la nucléoprotamine recombinée l'association des deux fractions est plus forte que dans la nucléohistone, ou même que la dissociation en milieu salin a été très incomplète.

Les conditions à réaliser pour que la DNase puisse agir sont telles que l'action de la chaleur s'associe à celle de l'enzyme pour désorganiser complètement la molécule. Le spectre du liquide est en tous points semblable à celui du bas polymère (II^e partie, § A). La présence d'une bande à 1 695 cm^{-1} dans le spectre du précipité indique par contre la

présence du haut polymère. Par conséquent l'acide nucléique, dès qu'il est dépolymérisé, passe en solution. La protéine, qui précipite, retient la fraction d'acide nucléique qui n'a pas été attaquée par la DNase. Bien qu'on ne puisse rien conclure sur la forme α ou β de la protéine d'après le spectre, comme nous l'avons vu, il est vraisemblable qu'elle est dénaturée.

Résumé et conclusions.

1° NUCLÉOHISTONE. — Dans les spectres de la nucléohistone on peut reconnaître la superposition de deux séries de bandes, les unes dues à l'acide nucléique, les autres dues à la fraction protéique de la molécule.

Nucléohistone à l'état de film (fig. 19). — Les bandes dues à la fraction protéique sont les suivantes :

— 1660 cm^{-1} (forte). Dichroïsme nul pour le film sec et pour le film hydraté ;

— 1535 cm^{-1} (moyenne) dans le film sec qui passe à 1545 cm^{-1} ; (moyenne) dans le film hydraté. Dichroïsme nul dans les deux cas.

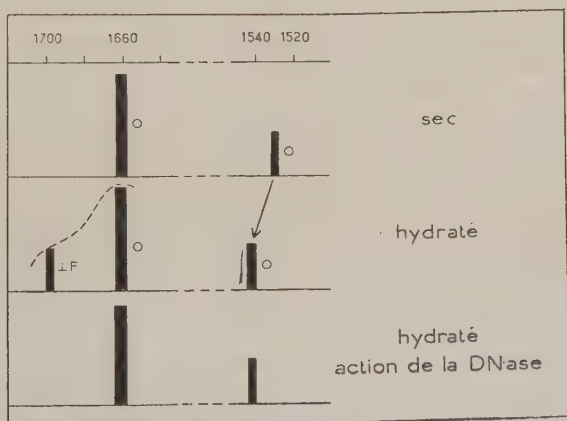


Fig. 19. — Nucléohistone. Films. Tableau des principales bandes.

$\perp F$: Dichroïsme perpendiculaire fort.

o : Dichroïsme nul.

→ : Effet de l'hydratation.

L'absorption à l'acide nucléique est représentée par un épaulement à 1705 cm^{-1} , à dichroïsme perpendiculaire, dans le film hydraté. Cet épaulement n'existe pas dans le film sec.

Nucléohistone à l'état de gel dans D₂O (fig. 20). — Les bandes dues à la fraction protéique sont les suivantes :

- une bande forte à 1650 cm^{-1} (ou deux sommets à 1660 - 1640 cm^{-1});
- une double bande à 1460 - 1440 cm^{-1} .

L'absorption due à l'acide nucléique se présente, dans la région de 2000 à 1300 cm^{-1} , sous la forme d'un épaulement situé vers 1692 cm^{-1} et dans la région de 1300 à 800 cm^{-1} sous la forme de trois bandes à 1090 , 1055 et 955 cm^{-1} .

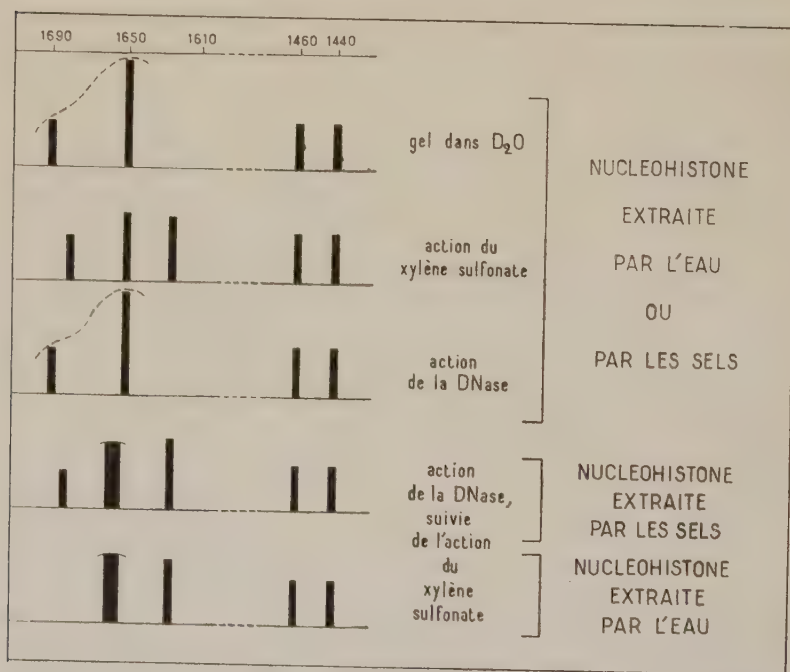


Fig. 20. — Nucléohistone 10 p. 100 dans D₂O. Tableau des principales bandes.

La dénaturation de la fraction protéique fait apparaître une bande à 1622 cm^{-1} et diminuer l'absorption à 1660 cm^{-1} .

Ainsi dans la nucléohistone, la fraction protéique présente donc les caractéristiques spectrales de la forme α . La forme β apparaît après dénaturation.

La fraction nucléique présente les caractéristiques de la structure B quand la nucléohistone est à l'état de film hydraté ou de gel. Cette structure disparaît d'une manière réversible quand la déshydratation du film est suffisante.

La DNase agit plus difficilement sur la nucléohistone à l'état de gel que sur l'acide nucléique isolé et laisse persister plus ou moins les caractères de la structure B. Cependant la molécule subit certainement des transformations car ces caractères disparaissent totalement si, après action de l'enzyme, on dessèche l'échantillon ou si on dénature la fraction protéique.

2° NUCLÉOPROTAMINE. — Les spectres de nucléoprotamine sont dominés par l'absorption due aux groupements basiques de l'arginine qui masquent totalement la bande amide I de la liaison peptidique. Il n'est pas possible de déterminer d'une manière certaine si la fraction protéique est en forme α ou en forme β , mais on peut soupçonner qu'elle est en forme α .

L'absorption due à l'acide nucléique est représentée par un épaulement situé à 1710 dans les films hydratés et par deux épaulements à 1695 et 1680 cm^{-1} dans les films deutérés hydratés et dans les solutions dans D_2O . Ces fréquences sont caractéristiques de la forme B. Elles sont modifiées dans les films secs.

CONCLUSION GÉNÉRALE

En étudiant le spectre infra-rouge de l'acide désoxyribonucléique nous avons pu mettre en relation certaines variations d'absorption avec des modifications structurales de la molécule.

En particulier, il existe une bande qui est caractéristique du haut polymère et qui varie avec l'hydratation. Nous avons établi une corrélation entre nos résultats et ceux obtenus grâce aux clichés de rayons X et montré que la structure A décrite par Franklin et Gosling correspond à une bande située à 1692 cm^{-1} , la structure B à une bande située à 1708 cm^{-1} . Ces résultats nous ont conduits à penser que les modifications structurales du DNA correspondent à des perturbations dans les liaisons hydrogènes unissant les bases puriques et pyrimidiques.

Nous avons également signalé qu'au cours de la deutération il se produit des changements complexes dans les bandes relatives aux doubles liaisons conjuguées des noyaux puriques et pyrimidiques.

L'étude du dichroïsme en infra-rouge polarisé apporte des données qui sont en accord avec les modèles proposés par Watson et Crick et par Wilkins et ses collaborateurs.

L'examen des spectres infra-rouges de l'histone nous a permis de montrer que c'est une protéine de forme générale globulaire présentant les caractéristiques spectrales de la structure dite α .

Dans le cas de la protamine, nous n'avons pu apporter de précisions de cet ordre, en raison de la forte absorption des groupements basiques qui dominent le spectre.

A l'aide des résultats concernant le DNA d'une part, l'histone d'autre part, nous avons établi que le spectre infra-rouge de la nucléohistone se compose de deux séries de bandes, les unes dues à la fraction nucléique, les autres dues à la fraction protéique de la molécule.

Dans une certaine mesure, il est possible de déterminer la structure de ces deux fractions dans la combinaison.

La fraction protéique présente les caractéristiques spectrales de la forme α . Elle est susceptible d'être dénaturée et de passer en forme β .

Le DNA semble pouvoir passer réversiblement de la forme B à la forme A dans les mêmes conditions que s'il était isolé. Il est donc en forme B dans la nucléohistone hydratée, en forme A dans la nucléohistone sèche. L'apparition de cette dernière forme se produit toutefois pour un taux d'humidité inférieur à celui observé dans le cas de l'acide isolé.

Le DNA paraît, dans beaucoup de cas, être protégé par l'histone et la protamine contre l'action des enzymes dépolymérisants. De plus, lorsque cette action se produit, elle est très particulière : la fraction nucléique continue à présenter l'absorption du haut polymère, mais la molécule subit certainement une désorganisation car les caractéristiques du haut polymère disparaissent si on dénature la fraction protéique ou si on dessèche l'échantillon.

Nous avons également étudié la nucléoprotamine qui comporte essentiellement des bandes dues à l'acide nucléique et des bandes dues à l'arginine. L'acide nucléique semble être le plus souvent en forme B et passer difficilement en forme A. La très forte absorption des groupements basiques ne nous a pas permis d'obtenir des données aussi précises que pour la nucléohistone.

C'est donc à propos de la nucléohistone que nous avons rassemblé les données les plus nombreuses. Les conclusions qui s'en dégagent peuvent être envisagées de deux points de vue différents : structural et biologique.

Sur le plan structural tout d'abord, il semble que dans cette molécule complexe, l'acide nucléique et la protéine gardent une certaine liberté réciproque. Toutefois dans certains cas l'histone exerce certainement une contrainte sur le DNA, en le protégeant, par exemple, contre l'action enzymatique, ou du moins en maintenant sa structure même si cette action s'exerce. Nous avons malheureusement peu de renseignements sur la façon dont la molécule est construite à partir de ses deux constituants. Nous avons vu que des travaux récents ont conduit Wilkins et Seeds à envisager un enroulement des chaînes peptidiques dans l'espace compris entre les spires du DNA. Dans ces conditions, il est clair que l'histone ne peut conserver sa forme générale globulaire. Mais il est probable que les chaînes peptidiques gardent leur structure, puisque les fréquences observées sont identiques dans l'histone et dans

la nucléohistone et correspondent à la forme α . Or, l'hypothèse de Wilkins et Seeds serait mieux en accord avec l'étirement de la chaîne en forme β . On ne peut actuellement élucider cette contradiction. Il convient cependant de remarquer que la structure qualifiée de β en spectrographie infra-rouge correspond essentiellement à la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires, c'est-à-dire entre plusieurs chaînes peptidiques étendues et accolées. On ignore quelles seraient les bandes caractéristiques d'une chaîne étendue isolée, telle que se trouve peut-être l'histone dans les spires de l'acide nucléique.

Sur le plan biologique, le résultat le plus frappant concerne l'effet protecteur exercé par l'histone. Lors des processus de division cellulaire, le rôle génétique proprement dit semble exclusivement réservé au DNA, et on ignore quelle est la fonction de la protéine. Peut-être cette fonction consiste-t-elle précisément à protéger et à fixer l'acide nucléique dans la cellule au repos. Le cycle des transformations subies par les protéines au cours de la caryocinèse pourrait correspondre à des modifications dans le degré de liberté du DNA et par conséquent avoir une influence sur son comportement.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

**Transfert d'information des acides nucléiques
aux protéines.**

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 9 janvier 1958.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH.

